

# Mogućnosti korištenja otpada prehrambene industrije u biogenoj sintezi nanoselena

---

**Dragaš, Anđela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:860635>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Andela Dragaš**

**Mogućnosti korištenja otpada prehrambene  
industrije u biogenoj sintezi nanoselena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj diplomski rad je nastao kao rezultat istraživanja u sklopu projekta „Primjena nanobiotehnologije u suplementaciji hrane sa selenom (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost.

This Master thesis was done as a result of investigations under the project entitled „Application of Nanobiotechnology for Nutritional Supplementation with Selenium – (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financed by Croatian Science Foundation.

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na stručnim savjetima, trudu i velikoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i dr.sc. Maji Sikirić Dutour te svim djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane na pomoći pri izvođenju rada. Zahvaljujem se svojim roditeljima, sestri Danijeli i bratu Zvonimiru na neizmjerljivoj podršci i razumijevanju tokom cijelog studija. Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali studentske dane.*

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1 Otpad prehrambene industrije.....	1
1.1.1 Polifenoli u otpadu prehrambene industrije, djelovanje i podjela.....	1
1.1.2 Komina masline .....	3
1.1.3 Komina rajčice .....	5
1.1.4 Komina mandarine .....	6
1.2 Selen .....	7
1.2.1 Uloge selena u organizmu .....	8
1.3 Nanoselen.....	9
1.3.1 Biomedicinska primjena nanoselena .....	9
1.3.2 Metode sinteze nanoselena .....	10
1.4 Biogena sinteza nanoselena pomoću biljnih ekstrakata .....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1 Kemikalije i pribor .....	14
3.2 Instrumenti .....	14
3.3 Plan eksperimentalnog rada .....	15
3.4 Priprema suhih ekstrakata komine masline, rajčice i mandarine .....	15
3.4.1 Priprema reagensa .....	15
3.4.2 Postupak.....	15
3.5 Biogena sinteza nanoselena .....	16
3.5.1 Priprema reagensa .....	16
3.5.2 Postupak.....	16
3.6 Određivanje raspodjele veličine čestica i zeta potencijala .....	18
3.7 Određivanje antioksidacijskog potencijala uzorka.....	19
3.7.1 TEAC metoda .....	19
3.7.2 Folin-Ciocalteu metoda .....	20
3.8 Statistička obrada podataka .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	22
4.1 Raspodjela veličine čestica, zeta potencijal i stabilnost biogenog nanoselena .....	22
4.1.1 Stabilnost biogeno sintetiziranog nanoselena .....	25
4.2 Antioksidacijski potencijal biogeno sintetiziranog nanoselena .....	31

5. ZAKLJUČCI .....	35
6. LITERATURA .....	36
7. SAŽETAK.....	42
Temeljna dokumentacijska kartica.....	44

## POPIS KRATICA

<b>ABTS :</b>	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat )
<b>DLS:</b>	Dynamic light scattering, Dinamičko raspršivanje svjetlosti
<b>FTIR:</b>	Furierova transformacija infracrvenog spektra
<b>HIV :</b>	Virus humane imunodeficijencije
<b>LDL :</b>	low – density lipoprotein, lipoprotein niske gustoće
<b>PEG :</b>	polietilenglikol
<b>PVA :</b>	polivinilni alkohol
<b>PVP :</b>	polivinilpirolidon
<b>TEAC :</b>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, Troloxu ekvivalentan antioksidativni potencijal
<b>TGF :</b>	transforming growth factor, transformirajući faktor rasta

# 1. UVOD

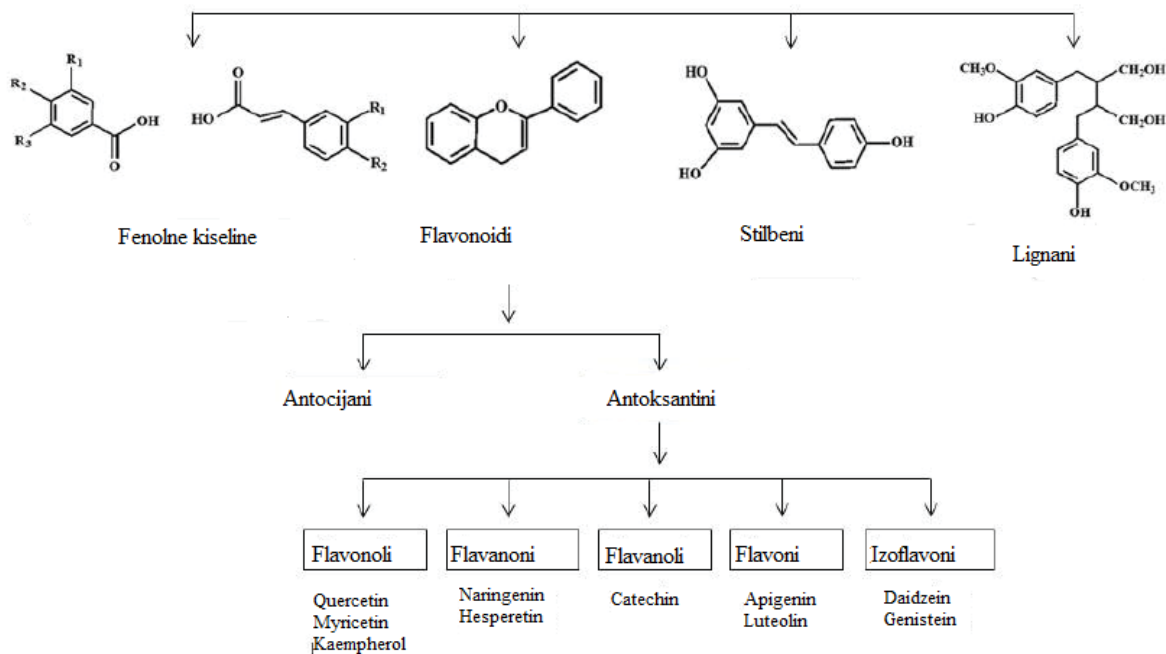
## 1.1 Otpad prehrambene industrije

Otpad prehrambene industrije postaje sve veći ekološki problem zbog mogućih negativnih utjecaja na sigurnost hrane, prirodne resurse, okoliš i zdravlje ljudi. Njegova naknadna valorizacija može pojednostaviti problem zbrinjavanja, a uz to može omogućiti i stvaranje proizvoda dodane vrijednosti (Saini i sur., 2018). Naime, neke vrste otpada prehrambene industrije već su prepoznate kao vrijedan izvor nutriceutika te ih u tom smislu smatramo važnim sekundarnim sirovinama (Goula i Lazarides, 2015). Primjerice, ekstrakti nekih od nusproizvoda bogati su polifenolima te se mogu koristiti u proizvodnji funkcionalne hrane ili dodataka prehrani (Mourtzinou i Goula, 2019). U tom smislu danas se najviše koriste ostaci nakon prerade jabuka, zelenog čaja i sjemenki grožđa, kao izvrsni izvori pektina, polifenola i drugih biološki aktivnih sastavnica. Posljednjih godina vrlo se intenzivno istražuju mogućnosti korištenja i drugih vrsta poljoprivredno-prehrambenog otpada (Abbasi-Parizad i sur., 2020).

### 1.1.1 Polifenoli u otpadu prehrambene industrije, djelovanje i podjela

U posljednjim desetljećima sve se veća pažnja pridaje polifenolima prisutnima u ostacima nakon prerade voća i povrća i njihovom iskorištavanju u druge svrhe (Di Donato i sur., 2017). Osnovna struktura polifenola temelji se na fenilpropanskome kosturu (C6- C3- C6), a njihova biološka aktivnost ovisi o broju, položaju i vrsti supstituenata (Slika 1). Polifenoli predstavljaju široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita i jednu od najvažnijih kategorija prirodnih antioksidansa. Zdravstveni učinak polifenola ovisi o količini unesenoj prehranom i bioraspoloživosti (Kurtagić, 2017). Zaštitna uloga fenolnih spojeva u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti „hvatanja” elektrona slobodnih radikala, keliranja iona prijelaznih metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza. Tako fenolni spojevi zbog svoje izražene antioksidacijske aktivnosti (ali i drugih tipova biološke aktivnosti) smanjuju rizik od pojave tumora, kroničnih i krvožilnih bolesti (Mitar i sur., 2019). Polifenoli u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namjericama pridonose gorčini, oštini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Berend i Grabarić, 2008).

## POLIFENOLI



Slika 1. Podjela polifenola (Manach i sur., 2004.)



### 1.1.2 Komina masline

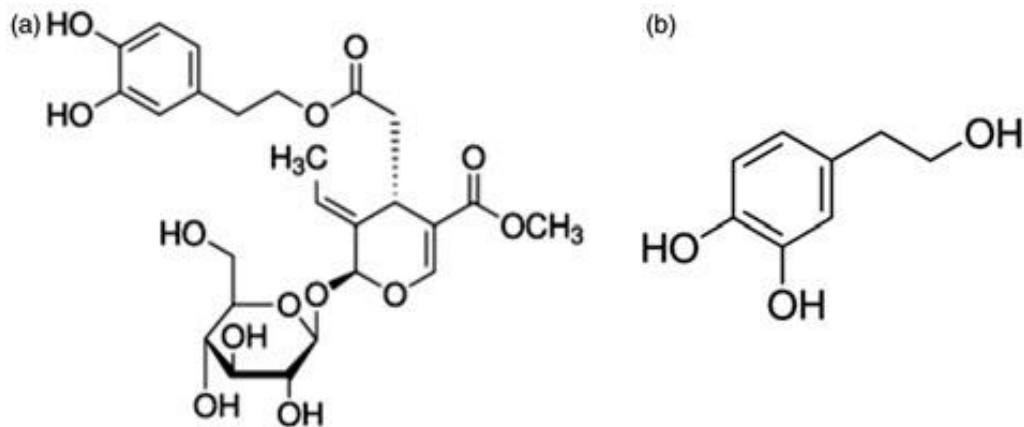
Tradicionalna mediteranska prehrana bogata voćem, povrćem, leguminozama, cjelovitim žitaricama promiče zdravlje i životni vijek. Maslinovo ulje jest glavni izvor masti u mediteranskoj prehrani. Epidemiološki podaci pokazuju da mediteranske zemlje imaju manju pojavnost kardiovaskularnih bolesti što se povezuje s mediteranskom prehranom i konzumacijom maslinovog ulja. Maslina (*Olea europea*) jest suptropska vazdazelena biljka iz porodice maslina (*Solanaceae*). Listovi su kožasti, ovalni, s donje strane srebrnasti. Bijeli cvjetovi skupljeni su u rahlim metlicama u pazušcu listova. Cvatu od svibnja do polovice lipnja, a plod dozrijeva od listopada do veljače, ovisno o odlici i klimatskim uvjetima. Zreo plod je ovalna, tamnoplava do crna koštunica bogata uljem ([www. enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)) (Slika 2).



Slika 2. Plod masline (preuzeto s [agroklub.com](http://agroklub.com))

U maslinovom ulju prevladavaju mononezasićene masne kiseline, a ono je ujedno i dobar izvor fitokemikalija polifenola, skvalena i  $\alpha$ -tokoferola (Stark i sur., 2002). U mediteranskim zemljama godišnje se proizvodi više od 2.4 milijuna tona maslina, 90% od toga za proizvodnju maslinova ulja (Goula i Lazarides, 2015). Maslinovo ulje se može ekstrahirati diskontinuiranim procesom prešanja te dvofaznim i trofaznim procesima centrifugiranja. Zemlje proizvođači maslinovog ulja suočene su s ozbiljnim izazovom ekološki prihvatljivog te ekonomski održivog zbrinjavanja otpada koji zaostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja (Azbar i sur., 2010). U Hrvatskoj, proizvođači maslinovog ulja su najčešće mala i srednja obiteljska poljoprivredna gospodarstva s ograničenim pristupom informacijama o gospodarenju otpadom te manjim mogućnostima ulaganja u njegovo zbrinjavanje (Kučić Grgić i sur., 2018). U agroindustrijskom

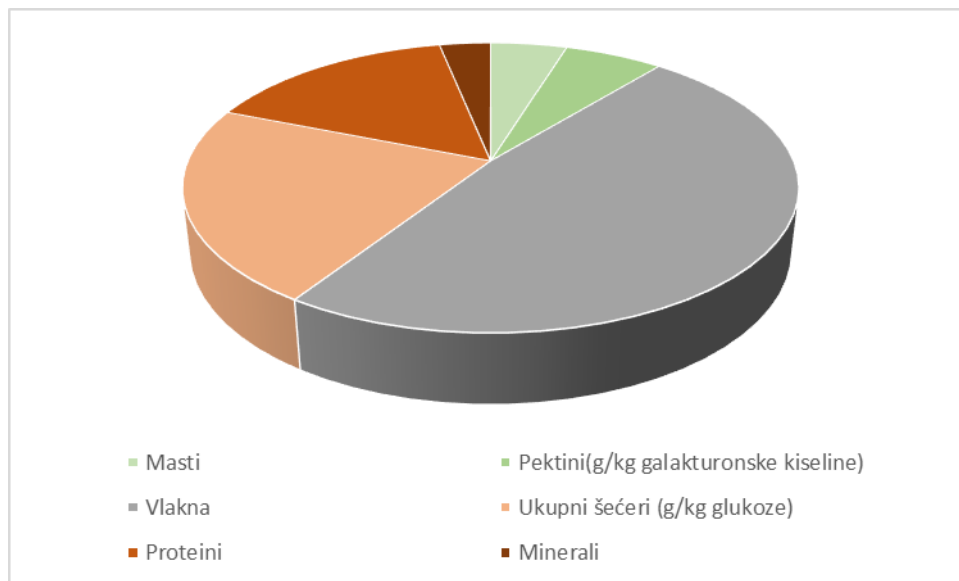
procesu prerade maslina u svrhu proizvodnje maslinovog ulja kao nusprodukti nastaju otpadna voda i komina masline koje karakterizira visoko organsko opterećenje, nizak pH i toksičnost (Grgić i sur., 2017). Procesom dvofaznog centrifugiranja dobiva se i treća vrsta otpada, tj. mješavina vegetabilne vode i komine. Komina masline sastoji se od kožice ploda, pulpe i dijelova koštice, a glavni kemijski sastojci su celuloza, bjelančevine, voda, polifenoli i ulje. Udio vode u komini varira ovisno o procesu prerade maslina (Brlek i sur., 2009). Otpadna voda je najbogatija polifenolima sa prosječnim udjelom od oko 150-400 mg/100 mL (Mourtzinou i Goula, 2019). U otpadnim vodama nakon obrade maslina otkriveno je preko 40 različitih fenolnih spojeva od kojih su najvažniji: oleuropein (Slika 3a), hidroksitirozol (Slika 3b), kavena kiselina i tirozol (Mitar i sur., 2019). Budući da su fenoli prisutni u plodu masline amfifilni, samo se dio njih nalazi u ulju, dok se veliki dio (>98 %) izgubi u čvrstom (45 %) ili tekućem otpadu (53 %) nastalom prilikom njihove prerade (Zrnčević, 2018). Bitno je napomenuti da visok sadržaj polifenola u komini doprinosi njenoj toksičnosti zbog potencijalnog fitotoksičnog djelovanja (Mitar i sur., 2019). U Hrvatskoj se komina masline slabo iskorištava jer nije prepoznat njezin sirovinski potencijal te najčešće završava kao otpad uzrokujući onečišćenje tla, a posljedično i voda (Kučić Grgić i sur., 2018).



Slika 3. Oleuropein (a) i Hidroksitirozol (b) (Parreira i sur., 2014.)

### 1.1.3 Komina rajčice

Rajčica (*Lycopersicon esculentum*) jednogodišnje je povrće, razgranate, zeljaste stabljike iz porodice Solanaceae ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Rajčica sadrži velik broj spojeva sa antioksidativnom aktivnošću poput karotenoida, askorbinske kiseline i fenolnih spojeva. Koža i sjemenke rajčice bogatiji su izvori polifenola te oni imaju veću antioksidacijsku aktivnost od frakcije pulpe (Silva i sur., 2018). U plodovima rajčice flavonoidi (kvercetin, kamferol i naringenin) predstavljaju najveći dio ukupnog sadržaja fenola (Fuentes i sur., 2013).

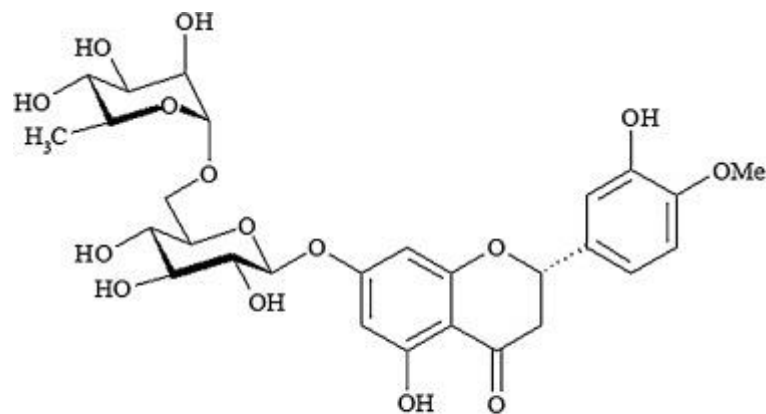


Slika 4. Sastav komine rajčice (prema: Del Valle i sur., 2006.)

Nusproizvod prerade rajčice, komina rajčice, sastoji se od kore i sjemenki i predstavlja oko 4% mase ploda. Sastav komine rajčice prikazan je na Slici 4. Komina rajčice bogata je hranjivim tvarima te bi se mogla koristiti kao izvor vlakana, proteina te masti (Del Valle i sur., 2006). Sadrži velike količine antioksidansa, među kojima je najzastupljeniji karotenoid likopen, iako sadrži i manju količinu fenolnih spojeva. Tijekom prerade rajčica dolazi do gubitka dijela fenolnih spojeva zbog oksidacijske razgradnje pa niže antioksidacijsko djelovanje komine rajčice (u odnosu na rajčicu) može biti posljedica nižeg sadržaja karotenoida i polifenola u usporedbi sa plodom (Fuentes i sur., 2013). Obzirom na značajnost svjetske industrije prerade rajčice, ponovna održiva i isplativa upotreba komine rajčice predstavljala bi održiv izvor antioksidansa i prehrambenih vlakana za prehrambenu industriju te bi se istovremeno smanjio ekološki otisak procesa prerade rajčice (Silva i sur., 2018).

### 1.1.4 Komina mandarine

Mandarina (*Citrus reticulata*) je zimzeleno, do tri metra visoko drvo iz roda *Citrus*. Spada u porodicu rutvica (*Rutaceae*), a podrijetlom je iz Kine. Listovi su tamnozeleni, duguljasti, uski, kopljasti, slabo do intenzivno mirisni, tanke peteljke sa slabo izraženim krilcima. Cvjetovi su bijeli, pojedinačni, plod spljošten ili okrugao, crvenkasto ili žutonarančaste, ugodno mirisne kore koja se lako odlupljuje od ukusna i sočna mesnoga dijela sastavljenoga od 9 do 14 kriškica međusobno isprepletenih mrežastim nitima ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Kora citrusa koja zaostaje nakon dobivanja soka je glavni sastojak nusproizvoda i predstavlja skoro 50% ukupne mase voća (Gaćina, 2014). U citrusima su identificirane mnoge fitokemikalije koje uključuju: vitamin C, karotenoide, flavonoide i limonide (Chinapongtitiwat, 2013). U citrusima kao što su naranče i limun najzastupljeniji flavonoidi su flavoni i flavononi. Citrusni flavanoni nađeni su u narančama, grejpu i limunu, među kojima je naringenin u najvećoj količini (Kurtagić, 2017). Ostatci mandarine nakon pripreve soka bogati su sa hesperidinom (Chinapongtitiwat, 2013) (Slika 5).

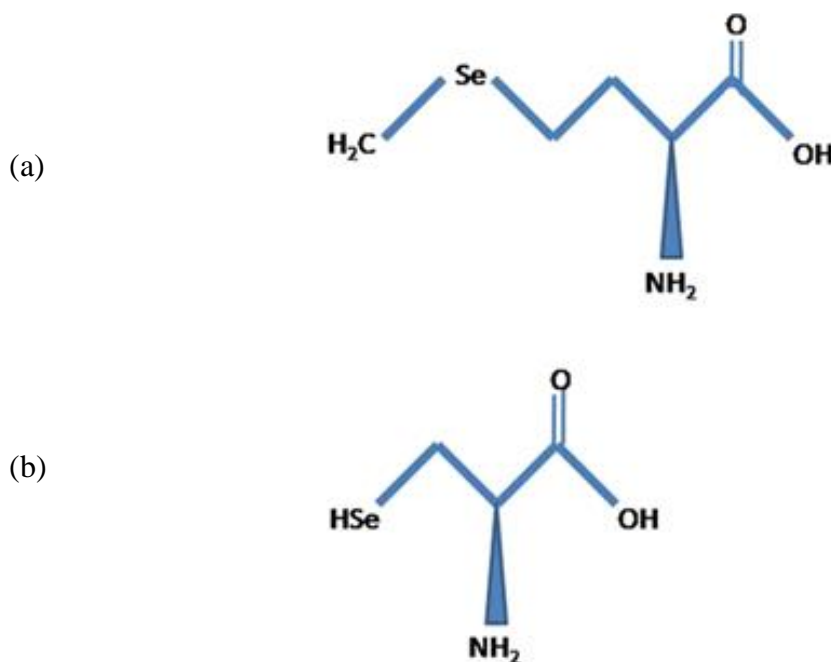


Slika 5. Hesperidin (Devi i sur., 2015.)

Nakon postupka ekstrakcije soka, 50 % se ukupne mase mandarina odbacuje kao otpad odnosno komina. Trenutno se komina mandarine najčešće usmjerava na odlagalište bez predobrade ili se izravno koristi kao sastojak stočne hrane ili gnojiva. U novije vrijeme, započinje se s korištenjem ostataka sušenih i fermentiranih mandarina u proizvodnji proteinskih i antioksidativnih nutriceutika (Nitayapat, 2013).

## 1.2 Selen

Selen ubrajamo u elemente u tragovima. Neophodan je za ljudski organizam u malim količinama dok u nešto većim količinama može biti toksičan. Ljudi i životinje trebaju selen za funkcioniranje više od 25 poznatih selenoproteina. Status selena uglavnom ovisi o unosu selena prehranom. Količina selena u određenoj vrsti biljne hrane ovisi o količini selena u tlu i nekoliko drugih čimbenika, kao što su pH tla, količina organske tvari u tlu i je li selen u tlu prisutan u obliku raspoloživom biljkama ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)). Istraživanja u Hrvatskoj ukazuju na smanjenu količinu selena u tlu i moguć nedostatak unosa selena u organizam (Dodig i Čepelak, 2004). Selen postoji u dva osnovna oblika: anorganskom (selenat i selenit) i organskom (selenometionin, selenocistein i metilirani oblici selena) (Slika 6). Tla sadrže anorganske selenite i selenate koje biljke nakupljaju i pretvaraju u organske oblike uglavnom u selenocistein i selenometionin i njihove metilirane derivate. Preporučeni dnevni unos selena je oko 55 µg. Morski plodovi i meso su najbogatiji izvori selena. Ostali izvori uključuju žitarice i mliječne proizvode ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)). Selen je toksičan u velikim dozama (>900 µg/dan), a znakovi toksičnosti uključuju: ispadanje kose, poremećaje noktiju, dermatitis, perifernu neuropatiju, mučninu, proljev, zamor, razdražljivost i dah koji ima miris na češnjak ([www.msd-priručnici.placebo.hr](http://www.msd-priručnici.placebo.hr)). Od dodatnog unosa selena koristi mogu imati osobe niskog statusa, međutim suplementacija osoba adekvatnog ili visokog statusa mogla bi rezultirati negativnim učincima te se ne preporučuje uzimanje dodatka prehrani sa suprafiziološkim dozama selena (Rayman, 2012).



Slika 6. Selenometionin (a) i selenocistein (b) (Sarkar i sur., 2015.)

### 1.2.1 Uloge selena u organizmu

Svoje biološke uloge u organizmu ostvaruje u obliku selenocisteina, u sastavu brojnih selenoproteina. Do sada karakterizirani selenoproteini (glutationperoksidaze, tioreduksin reduktaze, dejodinaze, selenoprotein P) sudjeluju u antioksidativnoj obrani organizma i regulaciji stanične redoks signalizacije, regulaciji hormonalnog statusa, popravljajući oksidativnih oštećenja makromolekula itd. Navedeni biološki učinci doprinose prevenciji različitih tipova karcinoma, funkcioniranju središnjeg živčanog sustava, zdravlju štitnjače, spermatogenezi i prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

Serumske koncentracije selena opadaju s godinama ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)). Smanjena ekspresija nekih selenoproteina uslijed neadekvatnog statusa selena povezuje se s neurološkim stanjima kao što su demencija, Parkinsonova bolest te epilepsija (Rayman, 2012).

U muškom reproduktivnom traktu selen je esencijalan za normalnu spermatogenezu i sazrijevanje sperme kao i za biosintezu testosterona (Ahsan i sur., 2014).

Poznato je da je štitnjača jedan od organa s najvišim sadržajem selena zbog značajne ekspresije nekoliko selen ovisnih enzima koji su važni za održavanje metabolizma hormona štitne žlijezde poput dejodinaze te onih koji sudjeluju u prevenciji oksidativnih oštećenja stanica štitne žlijezde poput plazmatske i citosolne glutation peroksidaze ili fosfolipid-hidroperoksid glutation peroksidaze. Značajan i dugotrajan nedostatak selena smanjuje produkciju hormona štitne žlijezde. Ispitivanja su pokazala da kod ozbiljnog nedostatka selena aktivnost glutation peroksidaze u štitnjači znatno opada. To dovodi do oksidacijskog oštećenja stanica praćenih nekrozom te invazijom tkiva štitnjače makrofazima i T limfocitima. Kronična upala uništava TGF ovisne procese što dovodi do atrofije žlijezde. Selen je također bitan za funkciju stanične i tkivne imunosti. Suplementacija selenom mogla bi smanjiti upalne procese unutar štitne žlijezde te spriječiti napredovanje bolesti (Köhrle i sur., 2020).

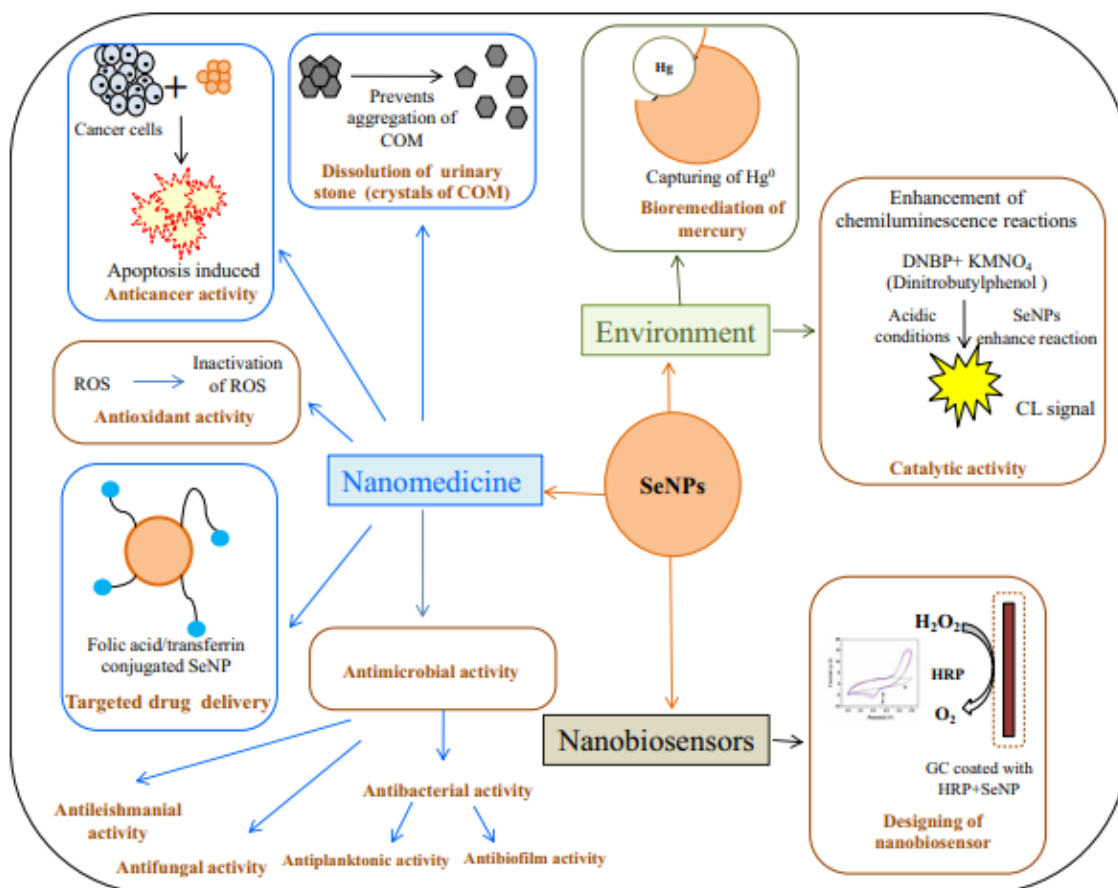
Niska razina selena povezana je također i s većom incidencijom kardiovaskularnih bolesti najčešće kao posljedice smanjene aktivnosti glutation peroksidaze. Uslijed takvog smanjenog uklanjanja slobodnih radikala dolazi do oksidacije LDL kolesterola i stvaranja plakova te do razvoja ateroskleroze (Benstoem i sur., 2015).

## **1.3 Nanoselen**

Nanotehnologija nailazi na široku primjenu u mnogim područjima poput farmacije, dijagnostike, zaštite okoliša, informacijskih tehnologija, inženjerstva, energetike, elektronike i kemijske industrije. Sinteza i primjena nanočestica elementarnog selena privukle su veliku pažnju zbog nekoliko prednosti uključujući kemijsku stabilnost, biokompatibilnost i nisku razinu toksičnosti u odnosu na anorganske soli selena (Skalickova i sur., 2017). Biološka svojstva čestica nanoselena ovise o njihovoj veličini i to na način da manje čestice obično imaju jaču biološku aktivnost. Nanoselen se vrlo lako prevodi u neaktivan oblik, zbog sklonosti aglomeraciji, te ga je potrebno inkapsulirati (Hoslendova i sur., 2018). Intestinalni transport nanočestica selena odvija se na dva načina: paracelularno (između stanica) ili transcelularno (kroz stanicu). Apsorpcija nanočestica selena veličine od 100 nm je 15-250 puta veća od apsorpcije nanoselena većih dimenzija (Skalickova i sur., 2017).

### **1.3.1 Biomedicinska primjena nanoselena**

Nanoselen ima širok spektar potencijalne primjene u nanomedicini. Rezultati brojnih studija pokazuju da upravo nanoselen ima antikancerogeni učinak koji se temelji na indukciji zaustavljanja staničnog ciklusa u S fazi. Tretiranje tumorskih stanica nanoselenom mijenja njihova biomehanička svojstva pri čemu posebno značajno smanjuje sile adhezije (Pi i sur., 2013). Nanočestice selena mogu poslužiti i kao nosači antitumorskih lijekova kao npr. doksorubicina kojem pritom povećavaju citotoksičnost i olakšavaju transport u stanice (Ramamurthy i sur., 2012). Zbog indukcije glutation-S-transferaze, nanoselen pokazuje i kemopreventivan učinak (Wang i sur., 2007). Može biti koristan u prevenciji cisplatinom izazvane gonadotoksičnosti te može spriječiti oštećenja stanica izazvana policikličkim aromatskim ugljikovodicima (Rezvanfar i sur., 2013; Ungvári i sur., 2014). Mnoga su istraživanja pokazala antimikrobno, antifungalno i direktno imunostimulativno djelovanje nanoselena kao i protektivan učinak kod intoksikacije sa metalima (Hoslendova i sur., 2018). Na Slici 7 prikazane su neke od mogućih primjena nanočestica selena.



Slika 7. Primjena nanoselena (Wadhvani i sur., 2016.)

### 1.3.2 Metode sinteze nanoselena

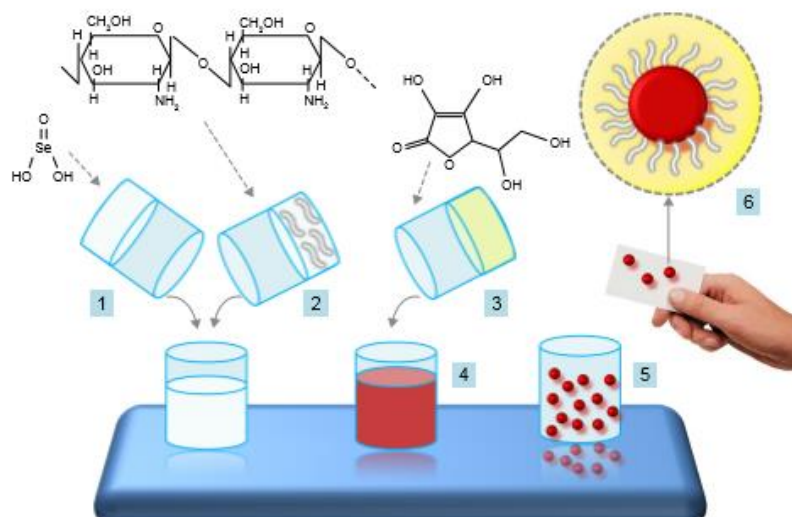
Odabirom metode sinteze, kontrolom koncentracije prekursora, pH te vremena i temperature reakcije mogu se dobiti čestice različitih veličina, oblika te svojstava površine. Tri su osnovne metode koje se koriste u sintezi metalnih nanočestica pa tako i nanočestica selena, a to su: fizikalne, kemijske i biološke metode (Skalickova i sur., 2017).

- **Fizikalne metode** su skupe zbog potrebnih instrumenata, te zahtijevaju strogu kontrolu temperature, pH te tlaka. Najčešće korištene fizikalne tehnike su tehnike isparavanja i pulsirajuće laserske ablacije.
- **Kemijske metode** su jednostavnije i jeftinije, ali često koriste kemikalije koje su ekološki neprihvatljive (Srivastava i Mukhopadhyay, 2015).
- **Biološke metode** koriste biološke sustave (bakterije, gljivice, biljke i aktinomicete) za stvaranje metalnih nanočestica iz metalnih iona (Srivastava i Mukhopadhyay, 2013).



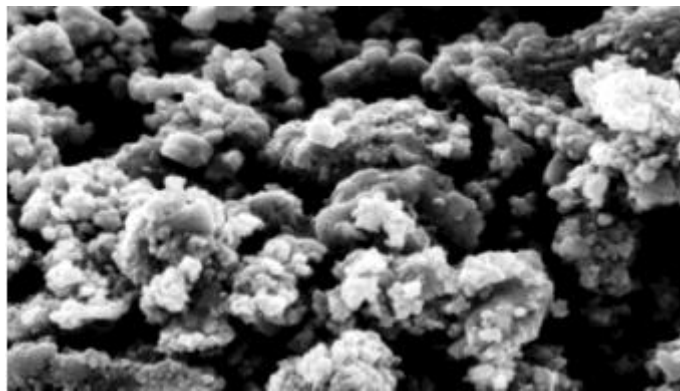
## 1.4 Biogena sinteza nanoselena pomoću biljnih ekstrakata

Biosinteza nanomaterijala pomoću biljnih ekstrakata relativno je novi pristup sintezi nanočestica i ima prednosti u odnosu na druge biološke metode jer je jeftina i ne zahtijeva nikakve posebne uvjete (Hoslendova i sur., 2017). Takav tip biogene sinteze je isplativiji u odnosu na upotrebu gljivica ili bakterija jer ne uključuje troškove izolacije mikroorganizama niti troškove medija za rast tih kultura. Biogeni sintetski put se često koristi zbog njegove jednostavnosti, a također i zbog činjenice da ne koristi toksična reducirajuća sredstva niti organska otapala (Sharma i sur., 2014). Biogena sinteza nanočestica selena postiže se redukcijom selenata/selenita u prisustvu bakterijskih proteina ili biljnih ekstrakata koji sadrže fenole, flavonoidne amine, alkohole, proteine ili aldehide koji mogu djelovati i kao redukcijsko sredstvo i kao stabilizatori nanočestica selena (Slika 7). Nanočestice selena imaju tendenciju udruživanja u veće klastere što rezultira manjom bioraspoloživošću, bioaktivnošću i biokompatibilnošću. Stoga su sredstva za njihovu inkapsulaciju od presudne važnosti za stabilizaciju i biološku aktivnost (Zhang i sur., 2018). Kemijska sredstva koja se najčešće koriste u tu svrhu su obični polimeri kao što su: PVP, PEG i PVA (Aisida i sur., 2019). Čestice nanoselena bez prisustva polimera kao što je npr. PVP kroz 2-3 tjedna formiraju agregate različitih oblika i veličina (Husen i Siddiqi, 2014).



Slika 7. Shematski prikaz biogene sinteze čestica nanoselena (Hoslendova i sur., 2017.)

Postupak stvaranja nanočestica započinje miješanjem metalne soli, polimera, redukcijskog sredstva kao npr. askorbinske kiseline te biljnog ekstrakta. Ioni metala se pritom reduciraju i prelaze u elementarno stanje te se manje susjedne čestice integriraju kako bi nastale termodinamički stabilne nanočestice. Cijeli proces prati promjena boje reakcijske smjese u crvenu te pritom nastaju polimerom inkapsulirane nanočestice selena (Hoslendova i sur., 2017). Na kvalitetu, veličinu i morfologiju nanočestica utječu svojstva biljnih ekstrakata uglavnom njegova koncentracija, vrijeme reakcije, koncentracija metalne soli, pH reakcijske otopine i temperatura (Verma i sur., 2019) (Slika 8). Biogena sinteza je poprilično učinkovitija od kemijske što je rezultat prisutnosti različitih bioreduktivnih skupina (Ramamurthy i sur., 2012).



Slika 8. SEM fotografija nanoselena sintetiziranog pomoću ekstrakta lista lavande

(Kirupagaran i sur., 2016.)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Industrijskom preradom voća i povrća nastaju velike količine otpada (kombine) bogate bioaktivnim sastavnicama, uglavnom polifenolima, karotenoidima i oligosaharidima. Velik broj tih spojeva ima snažnu redukcijsku sposobnost i/ili inkapsulacijski potencijal te oni na temelju navedenih karakteristika pokazuju potencijal za primjenu u procesima zelene sinteze nanoselena. Obzirom na kompleksan sastav kombine i širok spektar biološki aktivnih sastavnica, uspješan razvoj takvih procesa rezultirao bi formulacijom nanočestica poboljšanih karakteristika u odnosu na kemijski sintetizirane nanočestice (npr. direktnom antiradikalnom ili reduktivnom sposobnošću). Osim toga, na taj bi se način pridonijelo razvoju novih i održivih postupaka revitalizacije otpada i stvaranja novih proizvoda sa dodanom vrijednošću.

Cilj ovog istraživanja je optimizacija procesa primjene ekstrakta otpada koji zaostaje nakon prerade masline, rajčice i mandarine u biogenoj sintezi nanoselena. Glavni izazov ovog pristupa je optimirati uvjete sinteze kako bi se u konačnici dobile stabilne čestice zadovoljavajućih fizikalno-kemijskih karakteristika (veličine i zeta potencijala) sa izraženom antiradikalnom i antioksidativnom učinkovitošću.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1 Kemikalije i pribor

- Etanol (Kemig; Hrvatska)
- Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich)
- L-askorbinska kiselina (Kemika; Hrvatska)
- Polivinilpirolidon (Sigma Aldrich)
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich F9252)
- Bezvodni Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lach-Ner 30217-APO)
- ABTS (Sigma-A9941-50TAB)
- Kalijev persulfat (Kemika-11241)

### 3.2 Instrumenti

- Analitička vaga (Sartorius, Njemačka)
- Vodena kupelj (GFL 1086, Helago, Češka)
- Rotavapor (Buchi, Švicarska)
- Liofilizator (Christ Alpha 1-4 LOC-1, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
- Vortex miješalica (Multimode Plate Reader Victor™ X3 PerkinElmer®, Velika Britanija)
- Centrifuga (Centric 322A, Tehnica)
- Multikanalna pipeta Rainin Crux (Mettler-Toledo, SAD)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VictorX3, (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern UK)

### 3.3 Plan eksperimentalnog rada

- Izrada ekstrakta komine masline, rajčice i mandarine
- Sinteza nanoselena (kemijska i biogena)
- Analiza zeta-potencijala i raspodjele veličine čestica: nakon 3h, 24h i 148h
- Određivanje antioksidacijskog potencijala uzorka

### 3.4 Priprema suhih ekstrakata komine masline, rajčice i mandarine

#### 3.4.1 Priprema reagensa

- Etanol (60%): 312,5 mL 96 % etanola razrijedi se s vodom do ukupno 500 mL

#### 3.4.2 Postupak

Suhi ekstrakti pripremljeni su prema prethodno optimiranom protokolu za kominu masline (Albahari i sur., 2018) na način da se izvaže otprilike 10 g komine (masline, rajčice i mandarine) te se istome doda 200 mL 60% etanola (Tablica 1). Smjesa se potom inkubira 2h na 70 °C uz snažno protresanje (80-100 rpm). Dobiveni ekstrakti se potom profiltriraju kroz gusti filter papir te se etanol upari uz pomoć rotavapora (Slika 9). Dobiveni ekstrakti se liofiliziraju, a suhi ostatci se koriste kao sirovina za biogenu sintezu nanoselena.

Tablica 1. Priprema ekstrakata komine

UZORAK	OZNAKA	m komine/g	V(60% EtOH)/mL
Ekstrakt komine masline	M	10,0233	200
Ekstrakt komine rajčice	R	10,0365	200
Ekstrakt komine mandarine	C	10,0020	200



Slika 9. Uparavanje pomoću rotavapora (Fotografija: Anđela Dragaš)

## 3.5 Biogena sinteza nanoselena

### 3.5.1 Priprema reagensa

- PVP (1%): 1g PVP-a se otopi u 100 mL vode
- L-askorbinska (0.1 M): 1.938 g L-askorbinske se otopi u 110 mL vode
- $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0.1 M): 190,2 mg  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  se otopi u 11 mL vode
- Ekstrakt komine (10%): 500 mg ekstrakta komine se otopi u 5 mL vode

### 3.5.2 Postupak

Prije sinteze ekstrakti komine se profiltriraju kroz HPLC filtre (0.4  $\mu\text{m}$ ). U reakcijsku smjesu se doda 10 mL 0,1 M L- askorbinske kiseline, 9 mL 1% PVP-a, 8 mL vode te 1 mL 10 % ekstrakta komine (rajčice, mandarine ili masline). Za sintezu kontrolne otopine nanoselena dodaje se umjesto ekstrakta komine 1 mL vode više. Reakcijska smjesa se miješa na magnetskog miješalici (Slika 10). Potom se dodaje kap po kap  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  do ukupnog volumena od 1 mL pri čemu otopina mijenja boju u crvenu (što je pokazatelj redukcije selena u  $\text{Se}^0$ ).

Otopina se miješa ukupno još dvadeset minuta od početka dodavanja selenita. Potom se reakcijska smjesa prebaci u kivete za centrifugiranje od 50 mL te se centrifugira 20 min na 4100 g. Supernatant se potom odlije, a u istaložene nanočestice doda 15 mL vode. Radi dodatnog pročišćavanja ekstrakta (uklanjanje ostataka reakcijske smjese) talog se redispergira u 15 mL vode i ponovno centrifugira pod istim uvjetima. Supernatant se odlije, a pročišćeni talog selenovih nanočestica redispergira u 5 mL vode. Suspenzija se potom prebaci u Eppendorf tikvice i koristi za daljnja istraživanja (Tablica 2).



Slika 10. Sinteza nanoselena (Fotografija: Anđela Dragaš)

Tablica 2. Oznake sintetiziranih uzoraka

UZORAK	OZNAKA UZORKA
Kontrolna otopina nanoselena	nSe
Biogeno sintetiziran nanoselen korištenjem ekstrakta komine masline	bnSeM
Biogeno sintetiziran nanoselen korištenjem ekstrakta komine rajčice	bnSeR
Biogeno sintetiziran nanoselen korištenjem ekstrakta komine mandarine	bnSeC

### 3.6 Određivanje raspodjele veličine čestica i zeta potencijala

Veličina nanoselena u mjernim sustavima se određuje mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti na foton korelacijskom spektrofotometru sa „zelenim“ laserom ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ) pri temperaturi od  $25^\circ \text{ C}$  (Slika 11). Tehnika se temelji na različitoj frekvenciji izvora svjetlosti i svjetlosti raspršene sa čestice. Za određivanje veličine čestica intenzitet raspršene svjetlosti mjeri se pri kutu od  $173^\circ$ . Dobivene korelacijske funkcije analiziraju se algoritmima u Zetasizer programskom paketu. Nakon adekvatnog razrjeđenja svaki uzorak mjeren je šest puta, a rezultati se prikazuju kao raspodjela po volumenu. Promjena hidrodinamičkog promjera nanočestica se prati kroz 148 h. Također se mjeri i zeta potencijal čije se vrijednosti također prate kroz 148h.



Slika 11. Zetasizer Nano ZS (prilagođeno s [www.atascientific.com.au](http://www.atascientific.com.au))



## 3.7 Određivanje antioksidacijskog potencijala uzorka

### 3.7.1 TEAC metoda

Za određivanje ABTS<sup>•+</sup> antiradikalne učinkovitosti korištena je TEAC metoda, prema postupku Re i suradnika (1999), koja se temelji na mjerenju smanjenja apsorpcije prethodno pripremljene otopine ABTS<sup>•+</sup> radikala u prisutnosti spoja s antiradikalnim učinkom. ABTS<sup>•+</sup> radikal nastaje reakcijom između ABTS-a i kalijevog persulfata te je plavo-zelene boje. Dekolorizacija ABTS<sup>•+</sup> radikala, u prisustvu antioksidansa, može se izmjeriti na 734 nm. Kao standard se obično koristi Trolox (vodotopljiv oblik vitamina E) po čemu je metoda i dobila ime TEAC (Troloxu ekvivalentan antioksidativni kapacitet).

#### 3.7.1.1 Priprema reagensa

- ABTS (7 mM): 10 mg se otopi u 2,778 mL vode
- Kalijev persulfat (2,45 mM): 4,41 mg kalijeva persulfata se otopi u vodi te nadopuni do 10 mL
- Otopina ABTS<sup>•+</sup> radikala: pomiješaju se jednaki dijelovi otopine ABTS-a i otopine kalijeva persulfata te se ista ostavi 12-16 h u mraku na sobnoj temperaturi

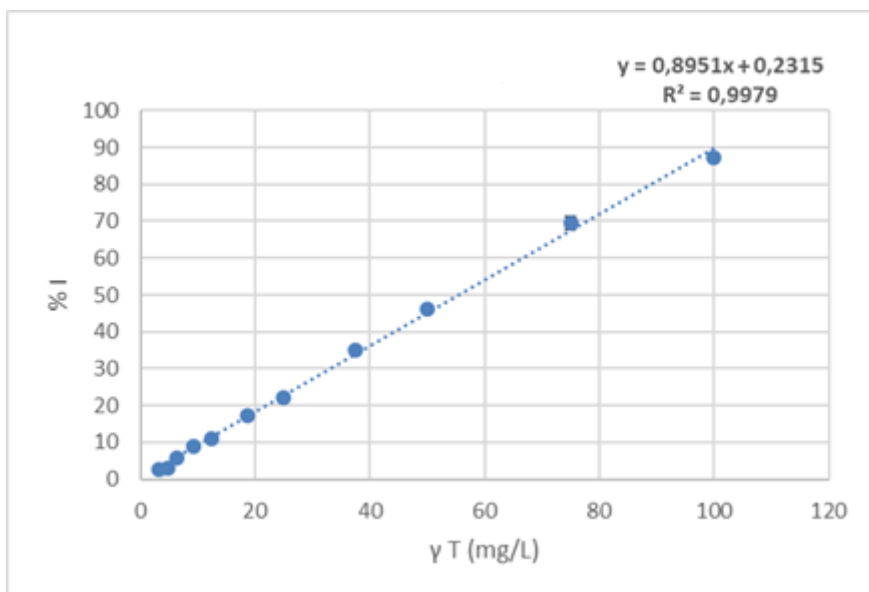
#### 3.7.1.2 Postupak

Mjerna otopina pripremi se pipetiranjem 200 µL razrijeđene otopine ABTS<sup>•+</sup> radikala te 20 µL adekvatno razrijeđenog uzorka ili vode kao slijepe probe. Otopina ABTS<sup>•+</sup> radikala se razrijedi 20 puta kako bi se dobila apsorbanacija od  $0.7 \pm 0.02$  AU. Uzorak se stavi u čitač mikrotitarskih pločica te se postavi da miješa ploču 60 sekundi te očita apsorbanaciju na 750 nm nakon inkubacije od 90 sekundi na 30° C .

Postotak inhibicije izračuna se iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije prema jednadžbi [1] .

$$\%I = \frac{A_{\text{slijepa proba}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{slijepa probe}}} \times 100 \quad [1]$$

Pomoću baždarnog dijagrama ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji standardnog antioksidansa Troloxa izračuna se antioksidacijski potencijal koji se izražava kao mg ekvivalenata Troloxa po litri (mg TE/L) (Slika 12).



Slika 12. Baždarni dijagram dobiven standardnim razrijeđenjem Troloxa

### 3.7.2 Folin-Ciocalteu metoda

Sadržaj ukupnih fenola (odnosno ukupni reduktivni potencijal) uzoraka određen je Folin-Ciocalteu metodom prema protokolu Singletona i Rossija (1965) uz neke modifikacije. Folin-Ciocalteu metoda temelji se na prijenosu elektrona u alkalnom mediju iz fenolnih spojeva (ili drugih spojeva sa redukcijskom aktivnošću) na fosfomolibdenske komplekse te komplekse fosfovolframove kiseline u žuto obojenom Folin-Ciocalteu reagensu. Pritom nastaju plavo obojeni kompleksi šesterovalentnog molibdena i šesterovalentnog volframa nepoznate strukture. Porast apsorbancije proporcionalan je količini polifenola odnosno svih spojeva sa reduktivnom aktivnošću i prati se spektrofotometrijski na 750 nm.

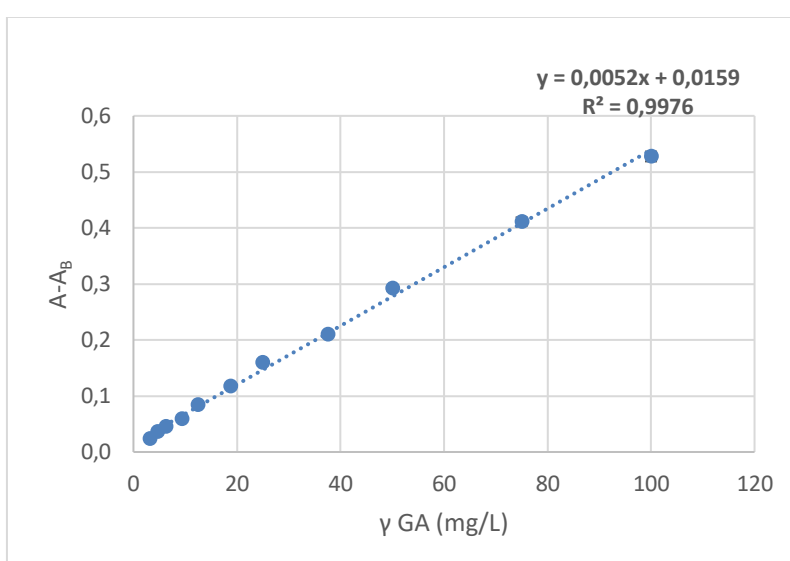
#### 3.7.2.1 Priprema reagensa

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 %): 3,015 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se otopi u 50 mL vode
- Folin-Ciocalteu reagens (10%): 500  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa razrijedi se sa 4500  $\mu\text{L}$  vode

### 3.7.2.2 Postupak

U jažice mikrotitarske ploče pipetira se 20  $\mu\text{L}$  adekvatno razrijeđenog uzorka ili vode kao slijepe probe te 50  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Ploča se stavi u čitač mikrotitarskih ploča na miješanje u trajanju od 60 sekundi te inkubaciju na 37° C u trajanju od 210 sekundi. Potom se multikanalnom pipetom doda 160  $\mu\text{L}$  3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , postavi se uređaj da miješa ploču 60 s te očita apsorbanciju na 750 nm nakon inkubacije od 1710 s.

Uz pomoć baždarnog dijagrama (Slika 13) ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline odredi se redukcijski potencijal, a rezultati se izraze kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po litri (mg GAE/L).



Slika 13. Baždarni dijagram dobiven razrjeđenjem galne kiseline

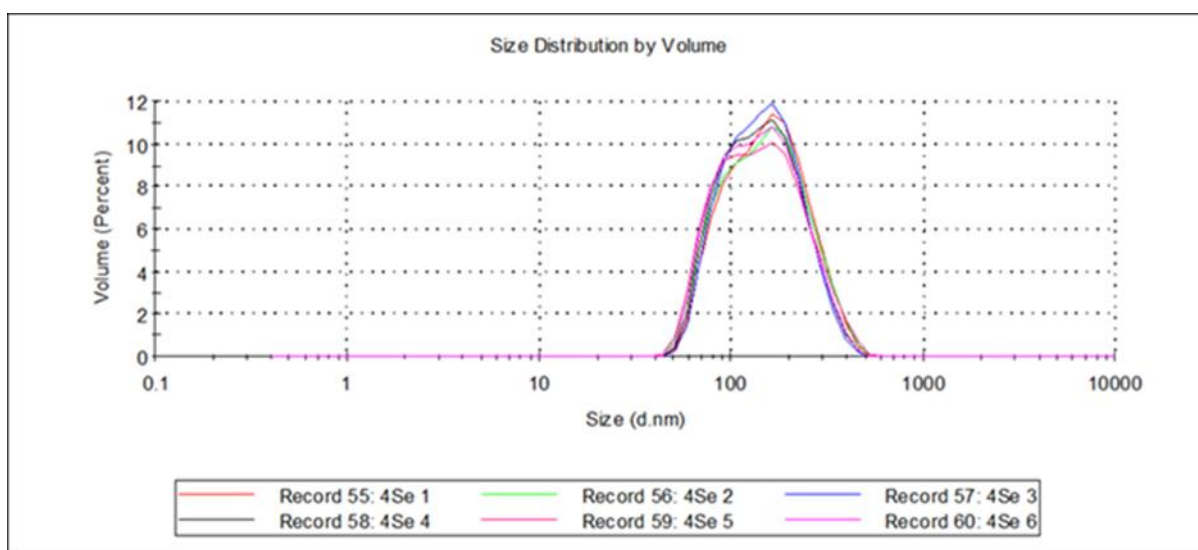
## 3.8 Statistička obrada podataka

Za statističku analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišteni su Microsoft Office Excel i GraphPad Prism 8.4.2 programi. Sinteza nanoselena (uz izuzetak kontrolne otopine nanoselena) provedena su u duplikatu, analize uzoraka rađene su u šesteroplikatu (raspodjela veličine čestica i zeta potencijal) (n=12) odnosno triplikatu (antioksidacijski potencijal) (n=6). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne i relativne standardne devijacije. Za usporedbu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance uz provođenje pos hoc Tukey-evog testa. Uzorci su statistički značajno različiti ako je  $p < 0.05$ .

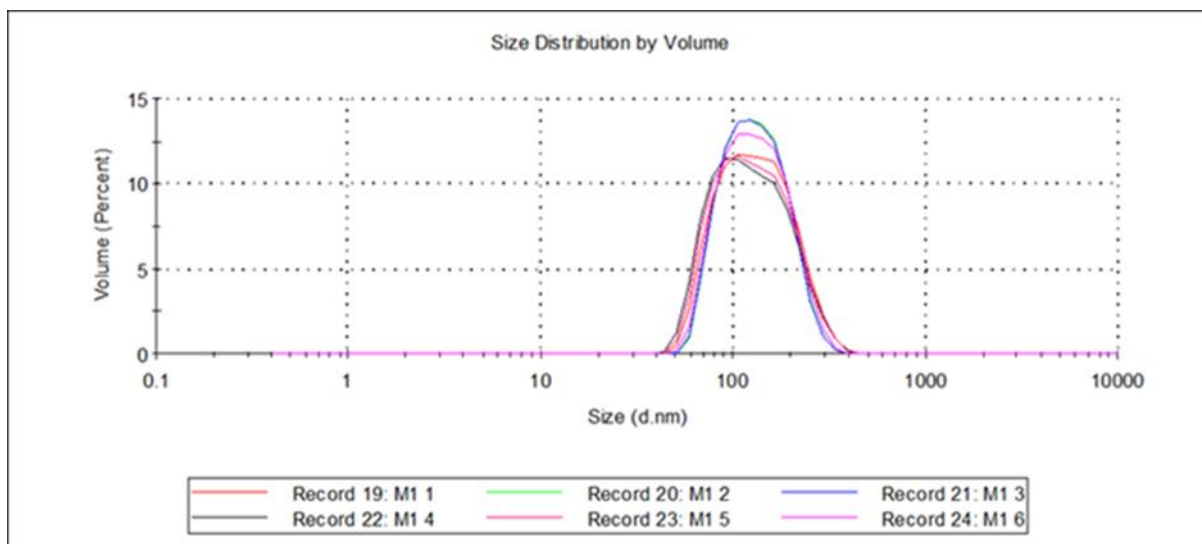
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Raspodjela veličine čestica, zeta potencijal i stabilnost biogenog nanoselena

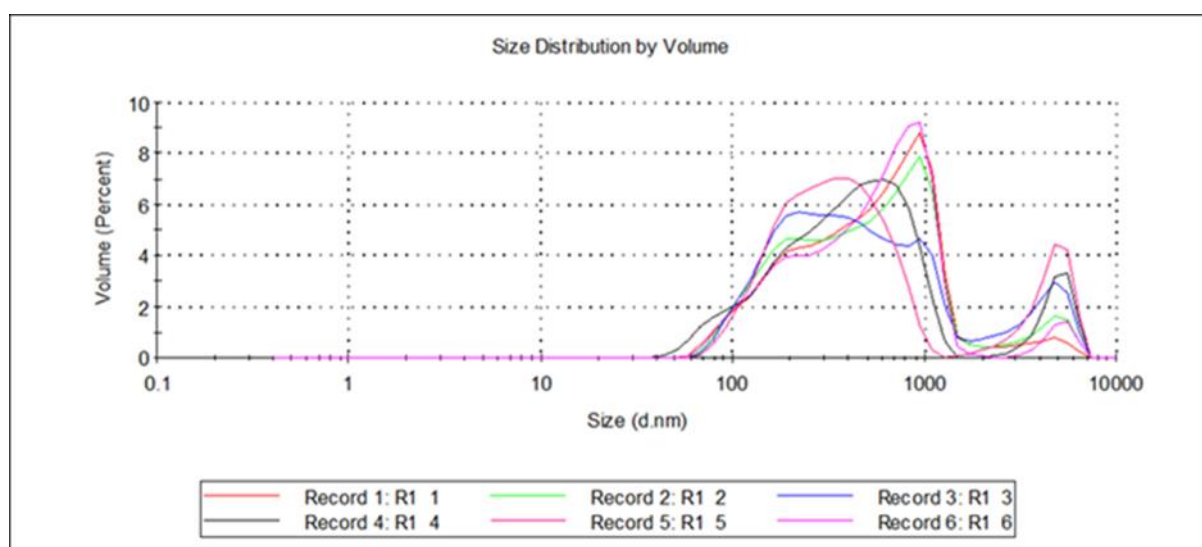
Rezultati raspona veličina čestica nanoSe prikazani su na Slikama 14-17. Kao što je vidljivo iz prikaza prosječna vrijednost hidrodinamičkog promjera za kemijski sintetiziran nanoselen iznosi 160,1 nm dok za nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline iznosi 131,8 nm. Te su čestice prikladne veličine budući da veće nanočestice nemaju prihvatljivu bioraspodjelivost (Skalickova i sur., 2017). Nanočestice sintetizirane korištenjem ekstrakta komine rajčice ili komine mandarine su velike s prosječnim vrijednostima hidrodinamičkog promjera 524,9 te 452,3 nm. One nisu stabilne te se s vremenom raspadaju na više frakcija iz čega se može zaključiti da su nanočestice sintetizirane korištenjem tih ekstrakata nestabilne.



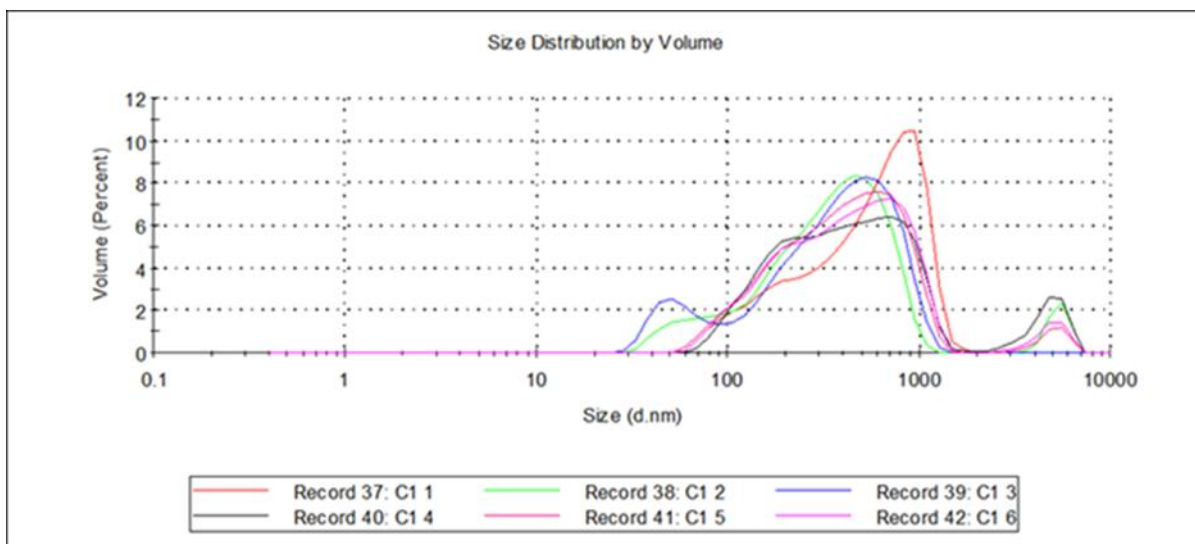
Slika 14. Raspodjela veličina čestica kontrolne otopine nanoselena (nSe)



Slika 15. Raspodjela veličina čestica nanoselena sintetiziranog korištenjem ekstrakta komine masline (bnSeM)



Slika 16. Raspodjela veličina čestica nanoselena sintetiziranog korištenjem ekstrakta komine rajčice (bnSeR)



Slika 17. Raspodjela veličina čestica nanoselena sintetiziranog korištenjem ekstrakta komine mandarine (bnSeC)

Iz prikaza 14-17 je vidljivo kako je raspodjela veličina čestica kemijski sintetiziranog nanoselena te nanoselena sintetiziranog uz ekstrakt komine masline monomodalna i uska. Vidljivo je kako su rezultati uzastopnih mjerenja za ta dva uzorka ponovljivi. Rezultati za uzorke nanoselena sintetizirane korištenjem ekstrakata komine rajčice i mandarine nisu ponovljivi, a raspodjela veličina čestica je vrlo široka. Na Slici 16 je vidljivo kako u mjerenim uzorcima bnSeR ima puno nanočestica čiji hidrodinamički promjer prelazi i 1000 nm. Nanočestice selena sintetizirane korištenjem ekstrakta komine mandarine također pokazuje vrlo širok raspon veličine čestica. Pojavljuje se mali volumni postotak populacije čestica hidrodinamičkog promjera oko 57 nm. Veće čestice, dominantnije populacije, imaju hidrodinamički promjer oko 468 nm.

Vizualnom provjerom uzoraka utvrđeno je da su nanočestice pripravljene korištenjem ekstrakta komine rajčice i mandarine već nakon kraćeg stajanja stvarale velike aglomerate i taložile se na dnu kivete, dok u uzorcima kemijski sintetiziranog nanoselena i nanoselena sintetiziranog uz dodatak komine masline nije bilo vidljivog taloženja.

### 4.1.1 Stabilnost biogeno sintetiziranog nanoselena

Kako bi se odredila stabilnost novosintetiziranih nanočestica praćena je raspodjela veličine čestica i zeta potencijal kroz 148 sati. Rezultati su analizirani te uspoređeni sa dostupnim literaturnim podacima o biogenoj sintezi nanoselena korištenjem biljnih ekstrakata. U Tablicama 3-5 i na Slikama 18-19 prikazane su vrijednosti srednjeg promjera nanočestica selena nakon 3 h, nakon 24h te nakon 148 h skladištenja.

Tablica 3. Srednji promjer čestica nanoselena nakon 3h skladištenja

Uzorak	<b>d<sub>h</sub> average</b>	<b>SD</b>	<b>RSD</b>
nSe	160,1	4,8	3,0
bnSeM	131,8	7,3	5,5
bnSeR	524,9	35,0	6,7
bnSeC	452,3	23,3	5,2

d<sub>h</sub> – srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, nSe – kontrolna otopina nanoselena, bnSeM – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline, bnSeR – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice, bnSeC – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine

Tablica 4. Srednji promjer čestica nanoselena nakon 24 h skladištenja

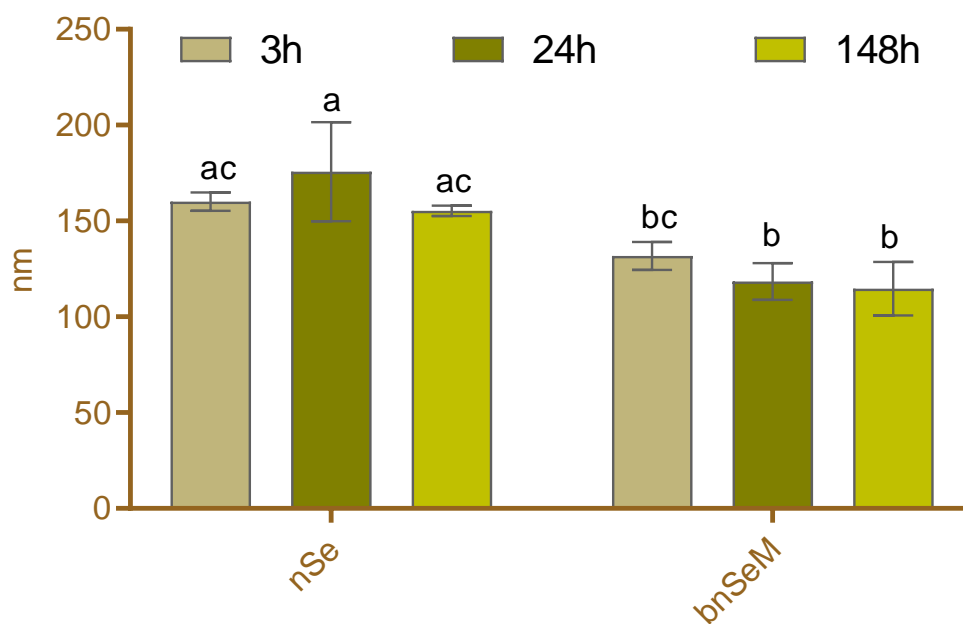
Uzorak	<b>d<sub>h</sub> average</b>	<b>SD</b>	<b>RSD</b>
nSe	175,8	25,8	14,7
bnSeM	118,4	9,6	8,1
bnSeR	474,2	125,6	26,5
bnSeC	406,5	64,0	15,7

d<sub>h</sub> – srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, nSe – kontrolna otopina nanoselena, bnSeM – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline, bnSeR – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice, bnSeC – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine

Tablica 5. Srednji promjer čestica nanoselena nakon 148 h skladištenja

Uzorak	<b>d<sub>h</sub> average</b>	<b>SD</b>	<b>RSD</b>
nSe	155,3	2,7	1,7
bnSeM	114,7	13,9	12,1
bnSeR	424,1	38,1	9,0
bnSeC	339,8	101,6	29,9

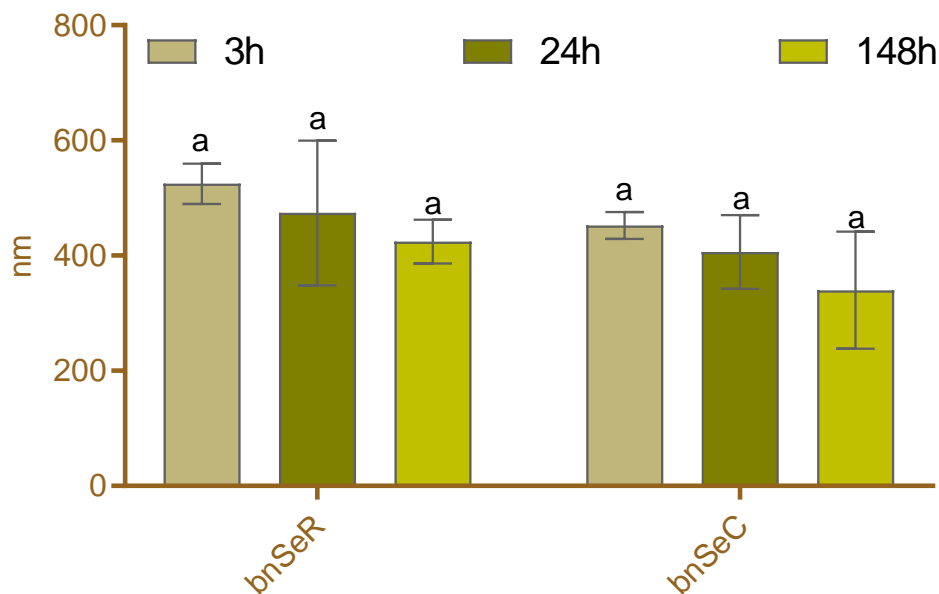
d<sub>h</sub> – srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, nSe – kontrolna otopina nanoselena, bnSeM – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline, bnSeR – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice, bnSeC – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine



Slika 18. Srednji promjer nanočestica selena pripremljenih kemijskom sintezom te sintetiziranih korištenjem ekstrakta komine masline tijekom skladištenja (3-148 h)

nSe – kontrolna otopina nanoselena (kemijski sintetizirana), bnSeM –nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline. Stupići označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p > 0.05$ )





Slika 19. Srednji promjer nanočestica sintetiziranih korištenjem komine rajčice i komine mandarine tijekom skladištenja (3-148 h)

bnSeR – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice, bnSeC – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine. Stupići označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

U Tablicama 6-9 i na Slici 20 prikazane su vrijednosti zeta potencijala, kemijski te biogeno sintetiziranog nanoselena, nakon skladištenja od 3h, 24h i 148h.

Tablica 6. Zeta potencijal nSe tijekom skladištenja (148h)

Uzorak	$\zeta$ average/mV	SD	RSD
nSe0	-8,4	0,1	-1,3
nSe24	-9,7	0,5	-4,6
nSe148	-7,4	0,4	-5,4

$\zeta$  average – srednja vrijednost zeta potencijala, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, nSe0 – kontrolna otopina nanoselena nakon 3h skladištenja, nSe24 – kontrolna otopina nanoselena nakon 24h skladištenja, nSe148 – kontrolna otopina nanoselena nakon 148 h skladištenja

Tablica 7. Zeta potencijal bnSeM tijekom skladištenja (148h)

Uzorak	$\zeta$ average/ mV	SD	RSD
bnSeM0	-8,3	0,7	-8,9
bnSeM24	-8,6	1,4	-16,5
bnSeM148	-11,0	1,5	-13,5

$\zeta$  average – srednja vrijednost zeta potencijala, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, bnSeM0 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline nakon 3h skladištenja, bnSeM24 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline nakon 24h skladištenja, bnSeM148 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline nakon 148 h skladištenja

Tablica 8. Zeta potencijal bnSeR tijekom skladištenja (148h)

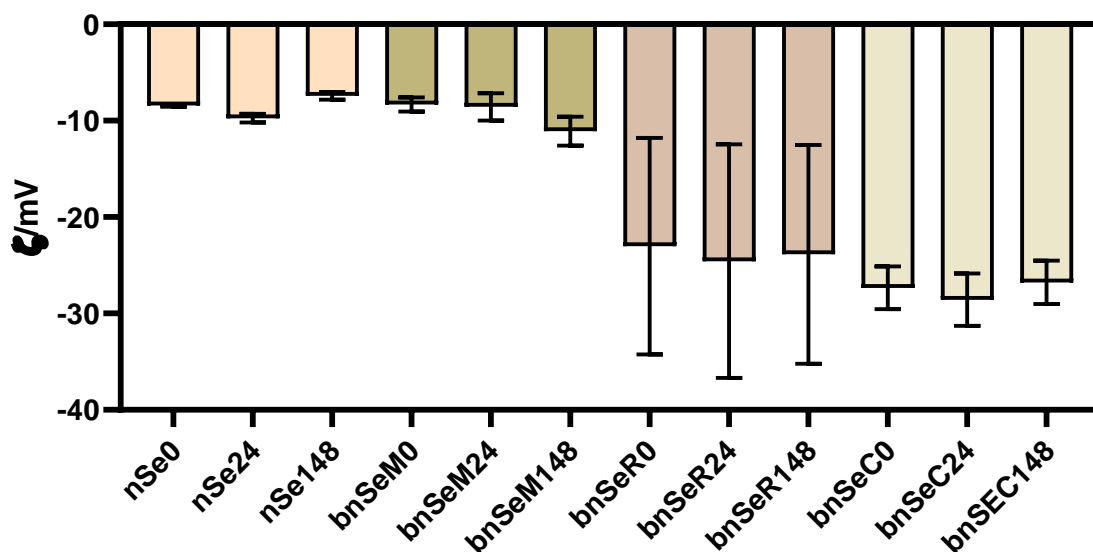
Uzorak	$\zeta$ average/ mV	SD	RSD
bnSeR0	-23,0	11,2	-48,8
bnSeR24	-24,6	12,1	-49,3
bnSeR148	-23,8	11,4	-47,6

$\zeta$  average – srednja vrijednost zeta potencijala, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, bnSeR0 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice nakon 3h skladištenja, bnSeR24 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice nakon 24h skladištenja, bnSeR148 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice nakon 148 h skladištenja

Tablica 9. Zeta potencijal bnSeC tijekom skladištenja (148h)

Uzorak	$\zeta$ average/ mV	SD	RSD
bnSeC0	-27,3	2,2	-8,2
bnSeC24	-28,6	2,7	-9,5
bnSeC148	-26,8	2,2	-8,4

$\zeta$  average – srednja vrijednost zeta potencijala, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, bnSeC0 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine nakon 3h skladištenja, bnSeC24 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine nakon 24h skladištenja, bnSeC148 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine nakon 148 h skladištenja



Slika 20. Zeta potencijal nanočestica selena ( nSe, bnSeM, bnSeR, bnSeC) tijekom skladištenja (148h)

ζ average – srednja vrijednost zeta potencijala, SD – standardna devijacija, RSD – relativna standardna devijacija, nSe0 – kontrolna otopina nanoselena nakon 3h skladištenja, nSe24 – kontrolna otopina nanoselena nakon 24h skladištenja, nSe148 – kontrolna otopina nanoselena nakon 148 h skladištenja, bnSeM0 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline nakon 3h skladištenja, bnSeM24 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline nakon 24h skladištenja, bnSeM148 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline nakon 148 h skladištenja, bnSeR0 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice nakon 3h skladištenja, bnSeR24 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice nakon 24h skladištenja, bnSeR148 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice nakon 148 h skladištenja, bnSeC0 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine nakon 3h skladištenja, bnSeC24 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine nakon 24h skladištenja, bnSEC148 – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine nakon 148 h skladištenja

Na Slici 20 vidljivo je kako je zeta potencijal nanočestica negativan; vrijednosti zeta potencijala za kontrolnu otopinu nanoselena i nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline iznose redom -8,42 i -8,31 mV. Apsolutne vrijednosti zeta potencijala za nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice ili mandarine puno su veće te iznose redom -23,01 mV i -27,33 mV.

Korištenjem ekstrakta komine masline dobivaju se nanočestice selena slične veličine, stabilnosti i zeta potencijala kao i korištenjem sintetskog coatinga PVP-a, što znači da se stabilizacija nastalih nanočestica selena postiže kombinacijom steričkih i elektrostatskih interakcija. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da se ekstrakt komine masline može koristiti kao prirodna obloga u sintezi nanoselena. Može se pretpostaviti da polifenoli i ugljikohidrati prisutni u ekstraktu adheriraju na jezgru nanočestica selena i sprječavaju njihovu aglomeraciju

tijekom skladištenja što sustav čini stabilnim. S druge strane, čestice nanoselena nastale korištenjem ekstrakta komine rajčice/mandarine imaju široku raspodjelu veličina čestica, velike su i vrlo nestabilne. Iz dobivenih rezultata možemo pretpostaviti da tijekom sinteze dolazi do adhezije nabijenih molekula iz ekstrakta na jezgre nanoselena, međutim nastaju veliki nestabilni negativno nabijeni aglomerati koji se stajanjem raspadaju. Većina navedenih interakcija ostvaruje se najvjerojatnije stvaranjem slabih ionskih veza, što potvrđuju visoke apsolutne vrijednosti zeta potencijala. Slične rezultate moguće je pronaći i u radovima drugih autora. Zhang i suradnici (2014) su sintetizirali nanoselen koristeći natrij selenit kao prekursor nanoselena, polisaharide goji bobica kao sredstvo za inkapsulaciju te ekstrakt zelenog čaja kao redukcijsko sredstvo u blagim uvjetima na sobnoj temperaturi. Što je bila veća koncentracija polisaharida goji bobica, čestice su bile manje i time prikladnije. Vrijednost zeta potencijala je bila -24.1 mV te se ona nije značajno promijenila ni u ponovljenom mjerenju nakon 30 dana, a prosječna veličina 258.7 nm određena DLS analizom. Veće čestice nanoselena dobivene su i korištenjem ekstrakta lista peršina koji je bogat s vitaminom C i raznim fenolnim spojevima. Veličina tako sintetiziranih nanočestica je u prosjeku nešto veća oko 400 nm, a raspodjela veličina čestica jest bimodalna s 25 % čestica manjih od 100 nm te 75 % čestica većih od 100 nm. Zeta potencijal iznosi -14.2 mV što ukazuje da takve nanočestice tvore stabilnu disperziju (Fritea i sur., 2017).

Iz dostupnih literaturnih podataka moguće je zaključiti da uspješnost biogene sinteze nanoselena odnosno karakteristike dobivenih nanočestica primarno ovise o kemijskom sastavu dobivenih ekstrakata. Iz nekih uspješnih primjera biogenih sinteza vidljivo je da polisaharide i neke vrste polifenola možemo smatrati najboljim prirodnim oblogama koje bi mogli ekstrahirati iz sekundarnih izvora. Primjerice, Sharma i suradnici (2014) su sintetizirali nanočestice selena korištenjem ekstrakta vinove loze. FTIR-om je dokazana prisutnost visoko stabilnog biopolimera lignina na površini nanočestica selena što ukazuje na moguću ulogu istog kao sredstva za inkapsulaciju. Dobivene su nanočestice selena promjera veličine  $8,12 \pm 2,5$  nm; bile su uniformne obzirom na srednji promjer i veličinu i mogle su se dalje koristiti u farmaceutske svrhe. Kokila i suradnici (2017) dobili su male nanočestice veličine 4-16 nm koristeći ekstrakt *Diospyros montane*. Promjene u veličini nanočestica nije bilo ni nakon 15 dana. Za sintezu nanočestica selena korišten je i ekstrakt indijskog ogrozda; dobivene su nanočestice prosječne veličine 20-60 nm, a raspodjela veličina čestica bila je uska što govori da je riječ o monodisperznom sustavu sa indeksom polidisperznosti manjim od 0,2. Čestice su bile stabilne zbog prisustva prirodne obloge na površini koja ne dopušta agregaciju (Gunti i sur., 2019). Aloe vera je također korištena u istu svrhu te su dobivene nanočestice prosječne veličine oko

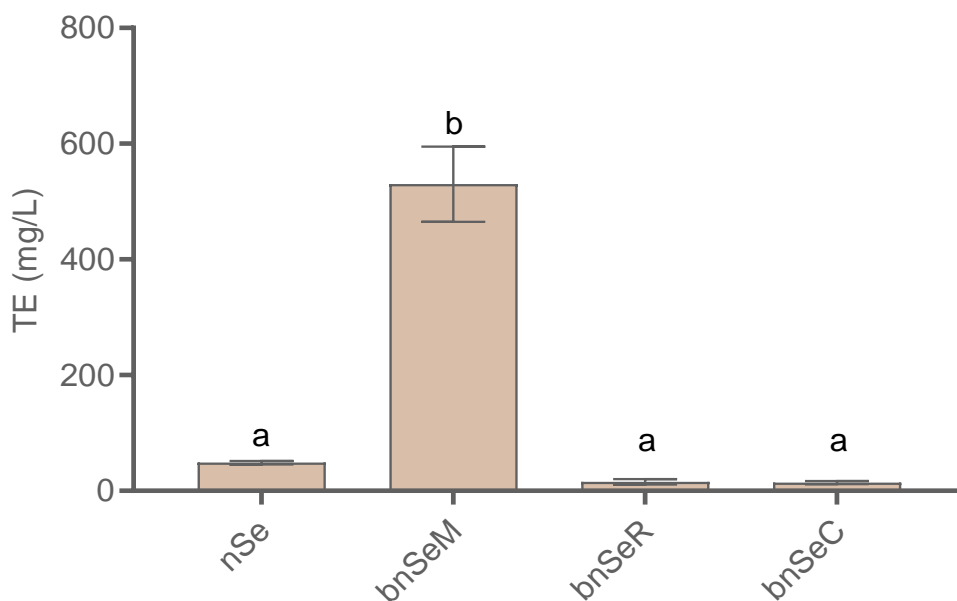
100 nm te zeta potencijala -18. Ekstrakt aloe vere sadrži bioaktivne komponente koje u svojoj strukturi posjeduju hidroksilne i amidne skupine koje su važne za redukciju iona selena u nanočestice te za stabilizaciju tih istih nanočestica. List aloe vere sadrži brojne vitamine, polisaharide, proteine, polifenole, lignin, saponine, sterole, flavonoide, enzime te organske kiseline (Fardsadergh, Jadarizadeh i Malmiri, 2019). Korištenjem ekstrakta piskavice dobivene su nanočestice selena veličine 50-150 nm. Askorbinska kiselina je korištena kao inicijator reakcija redukcije te selenična kiselina kao prekursor nanoselena ( Ramamurthy i sur., 2013). Za razliku od komine masline, primjena ekstrakta komine rajčice i mandarine u sintezi nanoselena nije se pokazala uspješnom. Pretpostavka je da primijenjeni uvjeti pripreme ekstrakta koji su optimirani za kominu masline nisu pogodni za kominu rajčice i mandarine zbog drugačijih fizikalno-kemijskih karakteristika bioaktivnih sastavnica. Stoga je u svrhu daljnjih istraživanja potrebno razviti specifične procese ekstrakcije kako bi se iz navedenih sirovina dobili ekstrakti bogati reducirajućim komponentama i/ili komponentama sa inkapsulacijskim potencijalom.

## **4.2 Antioksidacijski potencijal biogeno sintetiziranog nanoselena**

Jedna od važnih bioloških uloga selena jest njegova antioksidacijska aktivnost obzirom da u sastavu glutation-peroksidaza i tioredoksin-reduktaza sudjeluje u obrani organizma od oksidacijskog stresa (Wrobel i sur., 2016). S druge strane, polifenolni spojevi, visoko zastupljeni u ekstraktima komine masline, mandarine i rajčice, također pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost. Svoje učinke uglavnom ostvaruju putem dva osnovna mehanizma: sposobnosti hvatanja slobodnih radikala te svojom reduktivnom sposobnošću (Perron i Brumaghim, 2009).

Kako je prethodno napomenuto, osnovni ciljevi ovog rada bili su istražiti mogućnost primjene ekstrakata otpada hrane u biogenoj sintezi nanočestica selena poboljšanih svojstava, u smislu postizanja direktne antioksidacijske učinkovitosti. Naime, obzirom na činjenicu da PVP nema antioksidacijsku učinkovitost, kemijski sintetiziran nanoselen neće imati sposobnost redukcije niti hvatanja slobodnih radikala. S druge strane, ukoliko kao sredstva za oblaganje nanoselena koristimo prirodne spojeve koji su reducenski i imaju sposobnost hvatanja radikala, moguće je dobiti čestice koje će svoju antioksidacijsku učinkovitost ostvarivati putem više mehanizama.

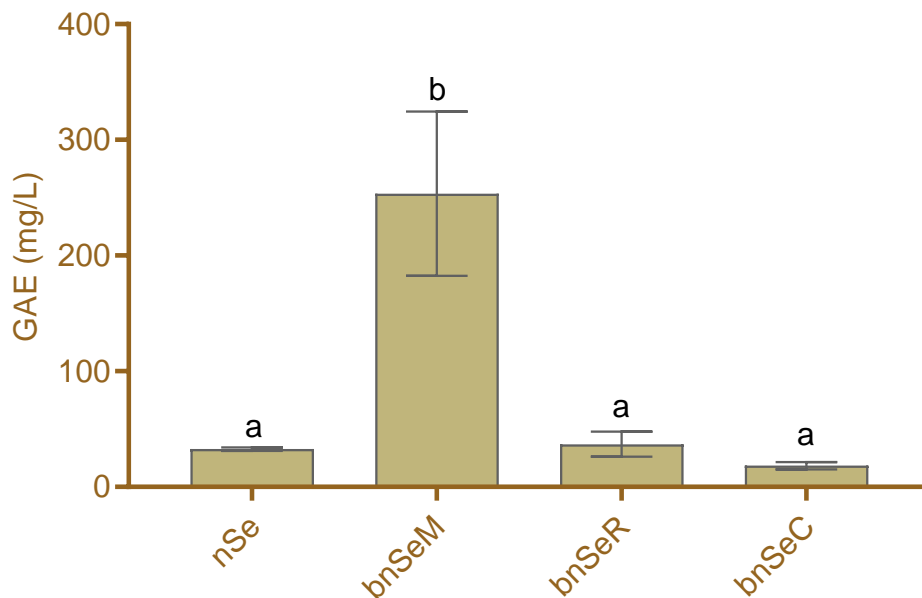
Rezultati istraživanja antiradikalne učinkovitosti nanoselena prikazani su na Slici 21. Prema očekivanjima, kemijski sintetiziran nanoselen nije pokazao antiradikalnu učinkovitost. Izmjerena aktivnost (mala) vjerojatno je posljedica zaostajanja tragova L-askorbinske kiseline u reakcijskoj smjesi obzirom da je sintetizirani nanoselen iz reakcijske smjese izdvajan postupcima opetovane centrifuge i ispiranja, bez korištenja dijalizijskih membrana. Očekivani porast antiradikalne učinkovitosti primijećen je jedino u uzorcima nanoselena sintetiziranog korištenjem ekstrakta komine masline dok, s druge strane, primjena ekstrakata rajčice i mandarine nije rezultirala pojavom antiradikalne učinkovitosti nanoselena. Razlog tome je vjerojatno činjenica da najznačajniju skupinu antioksidansa u rajčici i kori mandarine čine spojevi iz skupine karotenoida koji su lipofilni i nisu mogli biti ekstrahirani iz komine u uvjetima ekstrakcije korištenim u ovom radu. S druge strane, glavni nositelji antioksidacijske učinkovitosti komine masline su fenolne kiseline, fenolni alkoholi i spojevi iz skupine sekoiridoida, svi dobro topljivi u vodi.



Slika 21. Antiradikalna učinkovitost nanočestica selena određena TEAC metodom

TE – ekvivalenti Troloxa, nSe – kontrolna otopina nanoselena, bnSeM – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline, bnSeR – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice, bnSeC – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine

Sličan trend primjećuje se i promatranjem rezultata reduktivne sposobnosti nanoselena prikazanih na Slici 22. Jedini uzorak koji je pokazao značajnu reduktivnu sposobnost je uzorak nanoselena sintetiziranog korištenjem komine masline (253,4 mg GAE/L) što potvrđuje interpretaciju rezultata mjerenja antiradikalne učinkovitosti.



Slika 22. Reduktivna sposobnost nanočestica selena određena Folin-Ciocalteu metodom

GAE – ekvivalenti galne kiseline, nSe – kontrolna otopina nanoselena, bnSeM – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline, bnSeR – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine rajčice, bnSeC – nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine mandarine. Stupići označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Rezultate naših istraživanja potvrđuju i istraživanja drugih autora koja pokazuju kako nanočestice selena, sintetizirane korištenjem biljnih ekstrakata mogu ostvarivati antioksidacijske učinke dodatnim mehanizmima. Vyas i Rana (2017) su sintetizirali nanoselen korištenjem ekstrakta lista aloe vere. Postotak inhibicije ABTS radikala bio je 73 % za novosintetizirane nanočestice usporedno sa 54% za sami ekstrakt. To ukazuju na činjenicu da tako sintetizirani nanoselen ima veći antioksidacijski potencijal od samog ekstrakta. Nanoselen sintetiziran uz ekstrakt zelenog čaja, u koncentraciji 5-25  $\mu\text{M}$  značajno je inhibirao ABTS slobodne radikale proporcionalno s povećanjem doze takvog nanoselena. Ovakvi rezultati sugeriraju prisutnost polifenola u ekstraktu zelenog čaja (Zhang i sur., 2014). Alangesal i Venugopal (2018) su sintetizirali nanoselen koristeći ekstrakt biljke *Withania somnifera*. Antioksidacijski potencijal određen je DPPH metodom. Postotak gašenja DPPH radikala

povećavao se s povećanjem koncentracije tako sintetiziranih čestica nanoselena. Antioksidacijski potencijal nanoselena sintetiziranog korištenjem ekstrakta indijskog ogrozda određen je DPPH i TEAC metodom, a dobiveni rezultati ukazuju kako tako sintetizirani nanoselen ima značajan antioksidacijski potencijal (Gunti i sur., 2019).

Na temelju dostupnih podataka moguće je pretpostaviti da su najbolji prirodni ekstrakti za biogenu sintezu nanoselena oni koji sadrže hidrofilne antioksidanse koji će se adsorbirati na površinu nanoselena, stabilizirati čestice i zadržati svoju antiradikalnu i reduktivnu sposobnost. Antioksidacijsku sposobnost tako sintetiziranih nanočestica potrebno je dalje istražiti korištenjem kompleksnijih in vitro modela (npr. staničnih).



## 5. ZAKLJUČCI

1. Nanoselen sintetiziran korištenjem ekstrakta komine masline usporediv je sa kemijski sintetiziranim nanoselenom obzirom na raspodjelu veličina čestica, zeta potencijal i stabilnost.
2. Ekstrakti komine rajčice i komine mandarine ne mogu se koristiti u biogenoj sintezi nanoselena jer nastaju veliki aglomerati čestica koji se brzo raspadaju i rezultiraju taloženjem elementarnog selena nakon kratkog skladištenja.
3. Nanočestice selena sintetizirane korištenjem ekstrakta komine masline pokazuju značajan antioksidacijski potencijal potvrđen dvjema metodama, TEAC metodom te Folin- Ciocalteu metodom. Nasuprot tome, kemijski sintetizirane čestice nanoselena ne pokazuju ni antiradikalnu ni reduktivnu sposobnost.
4. Nanoselen sintetiziran uz ekstrakt komine rajčice ili komine mandarine ne pokazuje antioksidacijski potencijal. Navedeno bi moglo biti posljedica niske antioksidacijske učinkovitosti primijenjenih vodenih ekstrakta jer su glavni nositelji antioksidacijske aktivnosti navedenih sirovina lipofilni spojevi iz porodice karotenoida.
5. Buduća primjena komine rajčice/mandarine u biogenoj sintezi nanoselena trebala bi se temeljiti na razvoju učinkovitijih postupaka ekstrakcije i primjeni ekstrakata bogatih polifenolima i pektinima.
6. Poboljšana svojstva nanoselena sintetiziranog korištenjem ekstrakta komine masline u odnosu na kemijski sintetizirani potrebno je dodatno istražiti i to prvenstveno u smislu provođenja opsežnijih studija stabilnosti te istraživanja bioraspoloživosti i antioksidacijske aktivnosti korištenjem kompleksnijih in vitro modela.

## 6. LITERATURA

Abbasi-Parizad P, De Nisi P, Adani F, Pepé Sciarria T, Squillace P, Scarafoni A, Scaglia B. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of raw and fermented tomato pomace and their correlations with aglycate-polyphenols. *Antioxidants*, 2020, 9(2), 179.

Aisida SO, Ahmad I, Ezema FI. Effect of calcination on the microstructural and magnetic properties of PVA, PVP and PEG assisted zinc ferrite nanoparticles. *Physica B: Condensed Matter*, 2019, 411907.

Albahari P, Jug M, Radić K, Jurmanović S, Brnčić M, Rimac Brnčić S, Vitali Čepo D. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction // *Lebensmittel-wissenschaft und-technologie-food science and technology*, 2018, 92, 22-31.

Benstoem C, Goetzenich A, Kraemer S, Borosch S, Manzanares W, Hardy G, Stoppe C. Selenium and Its Supplementation in Cardiovascular Disease - What do We Know? *Nutrients*, 2015, 7(5), 3094–3118.

Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.

Brelek T, Voća N, Krička T, Jurišić V. Komina masline kao izvor energije, *Glasnik Zaštite Bilja*. 2009, 32 (3), 13-18.

Chinapongtitiwat V, Jongaroontaprangsee S, Chiewchan N, Devahastin S. Important flavonoids and limonin in selected Thai citrus residues. *J Funct Foods*, 2013, 5(3), 1151-1158.

Del Valle M, Càmara M, Torija ME. Chemical characterization of tomato pomace. *J. Sci. Food Agric.*, 2006, 86, 1232-1236.

Devi KP, Rajavel T, Nabavi SF, Setzer WN, Ahmadi A, Mansouri K, Nabavi SM. Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. *Ind Crop Prod*, 2015, 76, 582–589.

Di Donato P, Taurisano V, Tommonaro G, Pasquale V, Jiménez JMS, de Pascual-Teresa S, Nicolaus B. Biological Properties of Polyphenols Extracts from Agro Industry's Wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 2017, 9(9), 1567–1578.

Dodig S, Čepelak I. The facts and controversies about selenium. *Acta Pharm.*, 2004, 54, 261-276.

Fardsadergh B, Jadarizadeh – Malmiri H. Aloe vera leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their In vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains. *Green Process Synth*, 2019, 8, 399-407.

Fritea L, Lasio V, Cavalu S, Costea T, Vicas SI. Green biosynthesis of selenium nanoparticles using parsley and Petroselinum Crispum leaves extract. *Stud. Univ. "Vasile Goldiș" Arad, Ser. Științ. Vieții*, 2017, 27(3), 203-208.

Fuentes E, Carle R, Astudillo L, Guzmán L, Gutiérrez M, Carrasco G, Palomo I. Antioxidant and antiplatelet activities in extracts from green and fully ripe tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) and pomace from industrial tomato processing. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013.

Gaćina N. Alternativne sirovine prehrambenih vlakana, 123-130

Goula AM, Lazarides HN. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *J. Food Eng.*, 2015, 167, 45–50.

Gunti L, Dass RS, Kalagatur NK. Phytofabrication of selenium nanoparticles from *Emblica officinalis* fruit extract and exploring its biopotential applications: antioxidant, antimicrobial, and biocompatibility. *Front. Microbiol.*, 2019, 10:931, 1-17.

Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, Baron M, Melcova M, Opatrilova R, Zidkova J, Bjørklund G, Sochor J, Kizek R. Nano-selenium and its nanomedicine applications. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13, 2107-2128.

Husen A, Siddiqi KS. Plant and microbes assisted selenium nanoparticles: characterization and application. *J. Nanobiotechnology.*, 2014, 12, 1-10.

Kirupagaran R, Saritha A, Bhuvanewari S. Green synthesis of selenium nanoparticles from leaf and stem extract of *Leucas lavandulifolia* Sm. and their application. *J Nanosci Nanotechnol*, 2016, 2(5), 224-226.

Köhrle J, Gärtner R. Selenium and thyroid. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009, 23, 815-827.

Kokila K, Elavarsan N, Sujatha V. *Diospyros montana* leaf extract-mediated synthesis of selenium. *New J. Chem*, 2017, 41(15), 7481–7490.

Kučić Grgić D, Krivičić D, Vuković Domanovac M, Očelić Bulatović V. Obrada otpadnih tokova nastalih tijekom proizvodnje maslinova ulja. *Kem. Ind.*, 2018, 67, 289-295.

Kurtagić H. Polifenoli i flavonoidi u medu. *Food in health and disease*, 2017, 6, 28-35.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.

Mandarina, <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 20.2.2020.

Maslina, <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 12.2.2020.

Mitar A, Kučić Grgić D, Prlić Kardum J. Ekstrakcija i ispitivanje stabilnosti polifenola komine masline u prirodnim eutektskim otapalima. *Kem. Ind.*, 2019, 68, 407-414.

Mourtzinis I, Goula A. Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste. *Polyphenols in Plants*, 2019, 23–44.

Nitayapat N, Prakarnsombut N, Lee JS, Boonsupthip W. Bioconversion of tangerine residues by solid-state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the final products. *Food Sci Technol*, 2013, 63(1), 773-779.

Parreira P, Fátima Duarte M, Reis CA, Martins MCL. *Helicobacter pylori* infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014, 42(1), 94–105.

Perron NR, Brumaghim JL. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys*, 2019, 53, 75–100.

Pi J, Yang F, Jin H, Huang X, Liu R, Yang P, Cai J. Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, 23(23), 6296–6303.

Rajčica, <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 15.2.2020.

Ramamurthy C, Sampath KS, Arunkumar P, Kumar MS, Sujatha V, Premkumar K, Thirunavukkarasu C. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2017, 36(8), 1131–1139.

Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*, 2012, 379, 1256-1268.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med*, 1999, 26, 1231-1237.

Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR. Ahmadi A, Baeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 266(3), 356–365.

Saini RK, Moon SH, Keum YS. An updated review on use of tomato pomace and crustacean processing waste to recover commercially vital carotenoids. *Food Res. Int.*, 2018, 108, 516-529.

Sarkar B, Bhattacharjee S, Daware A, Tribedi P, Krishnani KK., Minhas PS. Selenium Nanoparticles for Stress-Resilient Fish and Livestock. *Nanoscale Research Letters*, 2015, 10(1).

Selen, 2014, <http://www.msd-priručnici.placebo.hr>, pristupljeno 19.2. 2020.

Selenium, <http://www.nih.gov>, pristupljeno 21.10.2019.

Sharma G, Sharma AR, Bhavesh R, Park J, Ganbold B, Nam JS, Lee SS. Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried *Vitis vinifera* (Raisin) extract. *Molecules*, 2014, 19, 2761-2770.

Silva YPA, Borba BC, Pereira VA, Reis MG, Caliari M, Brooks MS, Ferreira TAPC. Characterization of tomato processing by-product for use as a potential functional food ingredient: nutritional composition, antioxidant activity and bioactive compounds. *Int J Food Sci Nutr*, 2018, 1-11.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16, 144-158.

Skalickova S, Milosavljevic V, Cihalova K, Horky P, Richtera L, Adam V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, 2017, 33, 83–90.

Srivastava N, Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. *Powder Technol.*, 2013, 244, 26–29.

Srivastava N, Mukhopadhyay M. Green synthesis and structural characterization of selenium nanoparticles and assessment of their antimicrobial property. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2015, 38(9), 1723–1730.

Stark AH, Madar Z. Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nutr. Rev.*, 2002, 60, 170-176.

Ungvári É, Monori I, Megyeri A, Csiki Z, Prokisch J, Sztrik A, Jávör A, Benko I. Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity. *Food Chem Toxicol.*, 2014, 64, 298–306.

Verma A, Gautam SP, Bansal KK, Prabhakar N, Rosenholm JM. Green nanotechnology: Advancement in phytoformulation research. *Medicines*, 2019, 6, 39.

Vyas J, Rana S. Antioxidant activity and biogenic synthesis of selenium nanoparticles using the leaf extract of Aloe vera. *Int J Curr Pharm Res*, 2017, 9(4), 147.

Wadhvani SA, Shedbalkar U, Singh R, Chopade BA. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100(6), 2555–2566.

Wang H, Zhang J, Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Biol Med.*, 2007, 42(10), 1524–1533.

Wrobel JK, Power R, Toborek M. Biological Activity of Selenium. *Revisited International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 68 (2), 97-105.

Zhang W, Zhang J, Ding D, Zhang L, Muehlmann LA, Deng S, Wang X, Li W, Zhang W. Synthesis and antioxidant properties of Lycium. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2014,19, 2761-2770.

Zrnčević S. Valorizacija otpadnih voda prerade maslina. *Hrvatske vode*, 2018, 104, 75-90.

## 7. SAŽETAK

Otpad prehrambene industrije postaje sve veći ekološki problem zbog brojnih negativnih utjecaja na sigurnost hrane i prirodnih resursa, okoliš i zdravlje ljudi. Stoga rastu naponi za pronalazak inovativnih rješenja valorizacije prehrambenog otpada kao važnog izvora bioaktivnih spojeva s poželjnim biološkim učincima. Selen je element u tragovima koji je neophodan u malim količinama dok u većim količinama može biti toksičan, a bitan je za funkcioniranje više od 30 poznatih selenoproteina. Danas se intenzivno istražuju mogućnosti sinteze i primjene nanočestica elementarnog selena prvenstveno zbog manje toksičnosti. U ovom diplomskom radu istražena je mogućnost korištenja ekstrakata komine masline, rajčice i mandarine u biogenoj sintezi nanoselena. Raspodjela veličina čestica i zeta potencijal nanoselena određeni su mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti, a za određivanje antioksidacijskog potencijala korištene su jednostavne in vitro metode za mjerenje reduktivne sposobnosti i sposobnosti hvatanja radikala. Od svih istraženih ekstrakata jedino je ekstrakt komine masline pogodan za biogenu sintezu nanoselena jer, u usporedbi sa kemijski sintetiziranim nanočesticama, rezultira nastajanjem čestica slične veličine i stabilnosti, ali značajno veće antioksidativne učinkovitosti.



## **SUMMARY**

The food industry waste is becoming the significant ecological issue because of its negative impact on food safety, natural resources, the environment and health. Therefore, the efforts to valorize food waste as an important source of bioactive compounds with desirable biological effects are increasing. Selenium is an essential trace element with relatively high toxicity potential, and it is very important for the functioning of over 25 known selenoproteins. Due to lower toxicity of elemental selenium (in comparison to selenium salts) the efficient and sustainable synthesis protocols of selenium nanoparticles are being extensively explored. In this work, we investigated the possibility of using olive, tomato and tangerine pomace extracts in the biogenic synthesis of nanoselenium. Particle size distribution and zeta potential of the nanoparticles were determined by measuring the dynamic light scattering, and simple in vitro methods were used for measuring reductive capacity and antiradical efficiency. Obtained results showed that olive pomace extract was the only one suitable for the biogenic synthesis of nanoselenium because obtained nanoparticles showed similar size and stability but significantly higher antioxidant efficiency compared to those chemically synthesized.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Kemiju prehrane  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### MOGUĆNOSTI KORIŠTENJA OTPADA PREHRAMBENE INDUSTRIJE U BIOGENOJ SINTEZI NANOSELENA

Andela Dragaš

#### SAŽETAK

Otpad prehrambene industrije postaje sve veći ekološki problem zbog brojnih negativnih utjecaja na sigurnost hrane, prirodne resurse, okoliš i zdravlje ljudi. Stoga rastu naporima valorizacije prehrambenog otpada kao važnog izvora bioaktivnih spojeva s poželjnim biološkim učincima. Selen je element u tragovima koji je neophodan u malim količinama dok u većim količinama može biti toksičan, a bitan je za funkcioniranje više od 30 poznatih selenoproteina. Danas se intenzivno istražuju mogućnosti sinteze i primjena nanočestica seleno prvenstveno zbog manje toksičnosti. Biosinteza nanomaterijala pomoću biljnih ekstrakata ima prednosti u odnosu na druge biološke metode jer je jeftina i ne zahtijeva nikakve posebne uvjete. U ovom diplomskom radu istražena je mogućnost korištenja ekstrakata komine masline, rajčice i mandarine u biogenoj sintezi nanoselena u usporedbi sa nanoselenom sintetiziranim standardnom kemijskom metodom. Raspodjela veličine čestica i zeta potencijal nanoselena određeni su mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti, a za određivanje antioksidacijskog potencijala korištene su jednostavne in vitro metode za mjerenje reduktivne sposobnosti i sposobnosti hvatanja radikala. Od svih istraženih ekstrakata jedino je ekstrakt komine masline pogodan za biogenu sintezu nanoSe jer, u usporedbi sa kemijski sintetiziranim nanočesticama, rezultira nastajanjem čestica slične veličine i stabilnosti, ali značajno veće antioksidativne učinkovitosti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 22 grafička prikaza, 9 tablica i 57 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Otpad prehrambene industrije, komina masline, komina rajčice, komina mandarine, zelena sinteza nanoselena

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2020

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Food chemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### POSSIBILITIES OF FOOD INDUSTRY WASTE UTILIZATION IN BIOGENIC SYNTHESIS OF NANOSELENIUM

Andela Dragaš

#### SUMMARY

The food industry waste is becoming an alarming ecological issue because of its negative impact on the safety of food, natural resources, the environment and the health of people. Therefore, the efforts to valorize food waste as an important source of bioactive compounds with desirable biological effects are increasing. Selenium is an essential trace element with relatively high toxicity potential, and it is very important for the functioning of over 25 known selenoproteins. Due to lower toxicity of elemental selenium (in comparison to selenium salts) the efficient and sustainable synthesis protocols of selenium nanoparticles are being extensively explored. In this work, we investigated the possibility of using olive, tomato and tangerine pomace extracts in the biogenic synthesis of nanoselenium and obtained nanoparticles were compared to standard chemically synthesized nanoselenium. Particle size distribution and zeta potential of the nanoparticles were determined by measuring the dynamic light scattering, and simple in vitro methods were used for measuring reductive capacity and antiradical efficiency. Obtained results showed that olive pomace extract was the only one suitable for the biogenic synthesis of nanoselenium because obtained nanoparticles showed similar size and stability but significantly higher antioxidant efficiency compared to those chemically synthesized.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 22 figures, 9 tables and 57 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Food industry waste, olive pomace, tomato pomace, tangerine pomace, green synthesis of nanoselenium

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Jug, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2020