

# Biogena sintena nanočestica selena uz ekstrakt polifenola i pektina iz komine mandarine

---

Gosarić, Marta

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:163:805146>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

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



Marta Gosarić

**Biogena sinteza nanočestica seleno uz ekstrakt  
polifenola i pektina iz koline mandarine**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je 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 rad nastao je 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.

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na iznimnom strpljenju i bezuvjetnoj pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistenticama Kristini Radić i Nikolini Golub na ugodnom društvu i velikoj pomoći u izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvala mojim kolegama s fakulteta koji su obogatili moje studiranje, te mojim divnim prijateljicama iz srednje uz koje je sve zabavnije i lakše.*

*Veliko hvala mami i tati koji su mi bili podrška, kako u životu, tako i tokom cijelog studiranja, zahvalna sam što vas imam.*

*Najviše hvala mojem Nikoli na razumijevanju, strpljenju i vjeri u mene.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Selen .....	1
1.1.2. Oblici i izvor selena.....	1
1.1.3. Apsorpcija i metabolizam selena.....	2
1.1.4. Uloga selena .....	4
1.2. Nanočestice .....	7
1.2.1. Biogena sinteza nanočestica selena.....	7
1.3. Mandarina.....	8
1.4. Fenolni spojevi .....	9
1.4.1. Fenolne kiseline.....	9
1.4.2. Flavonoidi.....	9
1.5. Pektini.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Materijali .....	14
3.1.1. Kemikalije i pribor .....	14
3.1.2. Radni materijali i oprema .....	14
3.1.3. Plan eksperimentalnog rada .....	15
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Priprema uzorka kore mandarine .....	15
3.2.2. Ekstrakcija polifenola.....	15
3.2.3. Ekstrakcija pektina .....	16
3.2.4. Sinteza nanoselena .....	16
3.2.5. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom.....	18
3.2.6. Određivanje koncentracije selena.....	19
3.2.7. Određivanje zeta potencijala i raspodjele veličine čestica .....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. Određivanje koncentracije nanočestica selena u uzorcima .....	24
4.2. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom.....	25
4.3. Određivanje raspodjele veličine čestica .....	27
4.4. Određivanje zeta potencijala .....	28
5. ZAKLJUČCI .....	30
6. LITERATURA.....	31
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	35
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. Selen

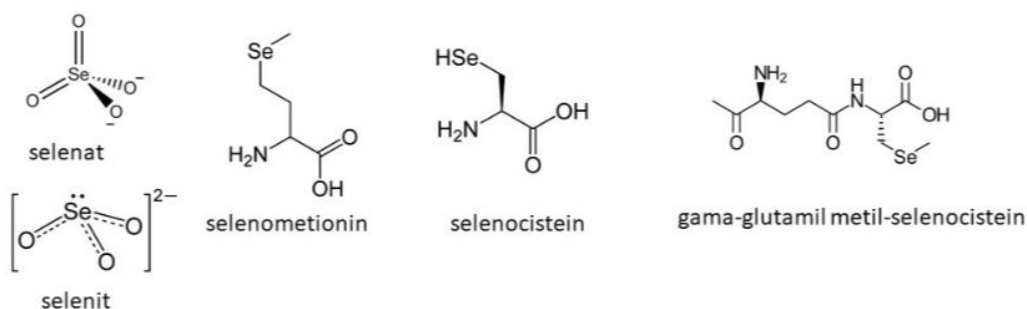
Selen je rijedak element u prirodi kojeg najčešće ga nalazimo u rudačama bogatima sulfidima. U esencijalne elemente ubraja se od 1973. godine kad je otkriven kao sastavni dio enzima glutation peroksidaze. Selen se ubraja u elemente u tragovima obzirom da se u biljnim i životinjskim vrstama i u tlu nalazi u izrazito maloj koncentraciji ( $\text{mg kg}^{-1}$  ili manje) koja je neizbježna za normalno stanično funkcioniranje. U prirodi se nalazi u 5 valentnih stanja; elementarni selen, selenid, selenit, selenat i tioselenat. (Läuchli, 1993). Ima sposobnost vezanje teških metala te na taj način sprječava apsorpciju teških metala u crijevima (Slunjski i Čoga, 2018).

### 1.1.2. Oblici i izvor selena

Selen u živim organizmima nalazimo u 2 oblika:

- Anorganski - selenat i selenit
- Organski - selenometionin, selenocistein i gama-glutamil-metil-selenocistein

Selenati i seleniti anorganski su oblici selena koji se nalaze u prirodi. U organskim oblicima selen je vezan za ugljikov atom aminokiseline metionin ili cistein. Selenometionin nalazimo u žitaricama, brazilskim orasima ili mesu, a selenocistein najčešće u ribi. Gama-glutamil-metil-selenocistein organski je oblik selena koji nalazimo u brokuli i porodici Alliaceae (<https://www.tecaj.plantagea.hr/proizvod/tecaj-selen>).



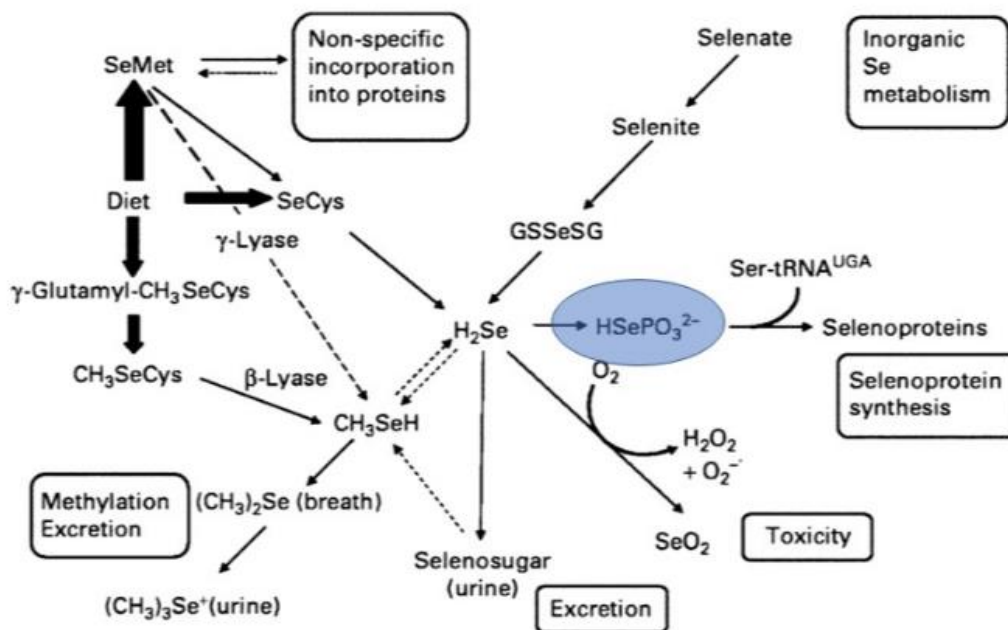
Slika 1. Kemijske strukture organskih i anorganskih oblika selena

(<http://tecaj.plantagea.hr/proizvod/tecaj-selen>)

Udio selena u živim organizmima može varirati, a jedan od čimbenika koji utječe na udio selena u biljnim namirnicama jest sastav i ispranost tla. Primjer je brazilski orah u kojem koncentracija selena može varirati od 0.85 do 6.86  $\mu\text{g/g}$  ovisno o količini selena u tlu. Veću koncentraciju selena imaju orasi iz zapadnog dijela Brazila u odnosu na orahe uzgajane u središnjem dijelu države. Postoje načini kultivacije gdje se dodaju male količine selenovih spojeva u gnojivo kako bi se povećala koncentracija selena u namirnicama (Roman i sur., 2013).

### 1.1.3. Apsorpcija i metabolizam selena

Apsorpcija anorganskog i organskog oblika selena u organizmu je vrlo dobra, a daljnji metabolizam ovisi o obliku u kojem je selen prisutan u plazmi kao što je i prikazano na Slici 2. Enzimskim metabolizmom iz selenometionina i selenocisteina nastaje vodikov selenid ( $\text{H}_2\text{Se}$ ), a iz njega kasnije nastaje selenofosfat ( $\text{HSePO}_3^{2-}$ ), oblik selena koji se ugrađuje u proteine. Selenometionin se može direktno i na nespecifičan način ukorporirati u enzime na način da zamijeni jednu aminokiselinu metionin. Drugačiji put metabolizma ima organski oblik - glutamil-metil-selenocistein koji se prvo pretvara u metil-selenocistein, a zatim se uz enzimsko djelovanje  $\beta$ -liaze pretvara u metilselenol koji se primarno izlučuje urinom ili dahom. Iz anorganskih oblika selenata i selenita također nastaje  $\text{H}_2\text{Se}$  uz prisutnost glutaciona (Fairweather-Tait i sur., 2010).



Slika 2. Metabolički put selena u ljudskom organizmu (Fairweather-Tait i sur., 2010)

Otpriblike 50% unešenog selena inkorporira se u organizam, a ostatak se metabolizira u glikozilirane ili metilirane spojeve selena koji se uklanjaju izdahom ili urinom. Metilacija selena događa se u jetri i bubregu, a ekskrecija se odvija putem urina (<http://plantagea/proizvod/tecaj-selen>). Metilirani oblici selena imaju dokazani antitumorski učinak, ali samo mali dio metiliranih oblika se zadrži u tijelu miša ili čovjeka ( Kapur i suradnici, 2017).

Unošenjem toksičnih doza selena iznad 400µg metaboliti selena luče se urinom i izdisanjem te je jedan od simptoma trovanja selenom miris po češnjaku. Simptomi trovanja selenom, tzv. selenoze su krhki nokti, mučnina i ispadanje kose. Za određivanje manjka selena u organizmu koristi se uzorak krvi ili urina. U krvi je referentna vrijednost 50-120µg/L, a razina od 80 µg/L smatra se dovoljnom za unos selena u proteine. Neki od lijekova koji mogu utjecati na manjak selena su cisplatin i karboplatin. Kod dugotrajne statinske terapije potencijalno može doći do smanjene mogućnosti ugradnje selena u proteine jer je za taj proces odgovoran izopentenil-pirofosfat, međuprodukt u sintezi kolesterola (<https://www.tecaj.plantagea.hr/proizvod/tecaj-selen/>).

*Tablica 1. Preporučeni dnevni unos selena*

Starost	Muškarci	Žene	Trudnoća	Dojenje
do 6 mj.	15 µg *	15 µg *		
7-12 mj.	20 µg *	20 µg *		
1-3 god.	20 µg	20 µg		
4-8 god.	30 µg	30 µg		
9-13 god.	40 µg	40 µg		
14-18 god.	55 µg	55 µg		
19-50 god.	55 µg	55 µg	60 µg	70 µg
51+ god.	55 µg	55 µg	60 µg	70µg

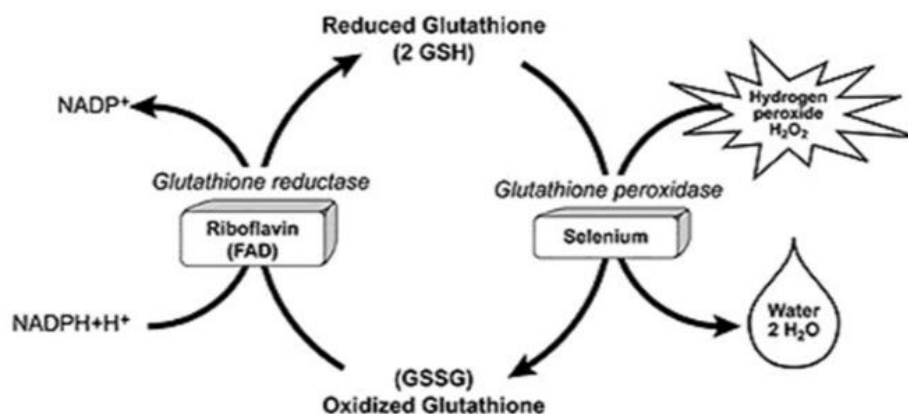
\*U toj dobi adekvatan unos temeljem procjene unosa hranom

#### 1.1.4. Uloga selena

Selen je bitan za normalno funkcioniranje 30 selenoproteina koji su prisutni kod životinja i ljudi. Otprilike 15 selenoproteina je dosad izolirano i opisane su njihove biološke funkcije, a neki od izoliranih proteina su glutation peroksidaze, jodotironin jodinaze, tioredoksin reduktaza, selenoprotein P, selenoprotein W i selenofosfatsintetaza. Sinteza selenoproteina jest regulirana intrinzičnim faktorima stoga povećani unos selena neće rezultirati i njihovom povećanom sintezom.

Selen je sastavni dio enzima koji imaju antioksidativnu ulogu u organizmu i razlikuje se od izravnih antioksidansa, primjerice vitamina C i E koji djeluju kao samostalne molekule u organizmu i koje izravno reduciraju oksidirajuće molekule. (<http://plantagea/proizvod/tecaj-selen>)

Glutation peroksidaza je enzim s antioksidativnom funkcijom u organizmu jer anulira, tj. kemijski transformira perokside (primjerice perokside masnih kiselina) koji normalno nastaju zbog oksidativnog metabolizma. Reakcija koju katalizira glutaciona reduktaza uključuje reakciju dviju molekula reduciranog oblika glutaciona koji reagira s vodikovim peroksidom, pri čemu nastaje oksidirani oblik glutaciona, glutacion disulfid i voda. Glutation je je tripeptid koji se sastoji od glicina, cisteina i glutamata i ima redukcijsko svojstvo (<https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/minerali/selen-se/>).



Slika 3. Prikaz ciklusa u kojem sudjeluje molekula glutaciona

([http://genomics.unl.edu/RBC\\_EDU/gp.html](http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/gp.html))

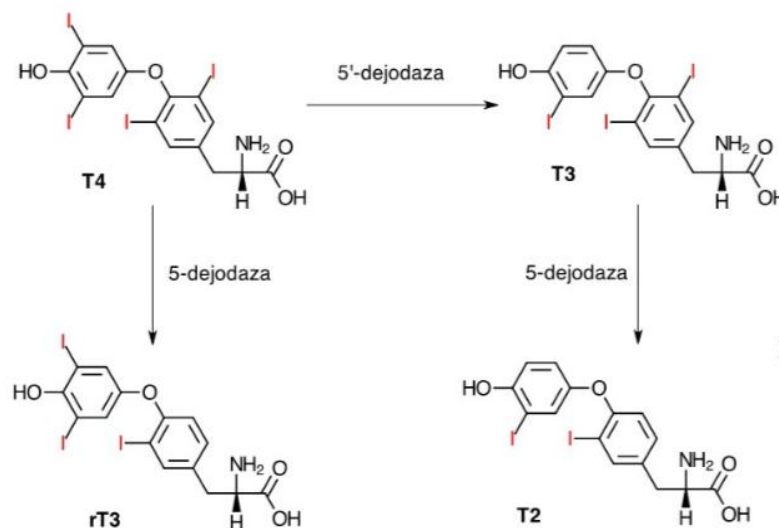
Tiroidna žlijezda sadrži najveći udio selena po gramu tkiva u ljudskom organizmu. Otprilike 80% hormona koje izlučuje nalazi se u obliku T<sub>4</sub>. U perifernim tkivima dolazi do micanja jednog od atoma joda i pritom nastaje T<sub>3</sub>, aktivni oblik hormona štitnjače. Za taj korak 5-mono-dejodinacije T<sub>4</sub> i nastanak aktivnog oblika hormona zaslužan je enzim jodotironin



dejodinaza koji u svojoj strukturi sadrži selenocistein(<https://www.tecaj.plantagea.hr/proizvod/tecaj-selen/>). Postoje tri različite selen-ovisne jodotironin dejodinaze (I, II i III) koje imaju utjecaj na normalan razvoj, rast i metabolizam upravo regulacije nastanka aktivnog oblika hormona štitnjače. Jodotironin dejodinaza I nalazi se u štitnjači, jetri i bubrezima, dok se jodotironin dejodinaze II i III nalaze i u koži, hipofizi, adipoznom tkivu, srcu, mišićima i mozgu. Jodotironin dejodinaza I može provesti reakciju dejodinacije oba prstena T4, dok jodotironin dejodinaza II može samo dejodirati vanjski prsten T4. Navedena se dva enzima smatraju aktivirajućim enzimima. Jodotironin dejodinaza III se smatra glavnim inaktivirajućim enzimom, jer provodi reakciju uklanjanja joda s unutarnjeg prstena T4 pri čemu nastaje reverzni T3 (Tingjj, 2008).

Hashimotov tireoiditis autoimuna je bolest kod koje dolazi do kronične upale štitne žlijezde, što dovodi do smanjenog funkcioniranja žlijezde. Vlastiti imunološki sustav napada štitnu žlijezdu koja ne proizvodi odgovarajuće količine hormona štitne žlijezde (<https://dokaziumedicini.hr/selen-za-hashimotov-tireoitidis-i-hipotireozu>).

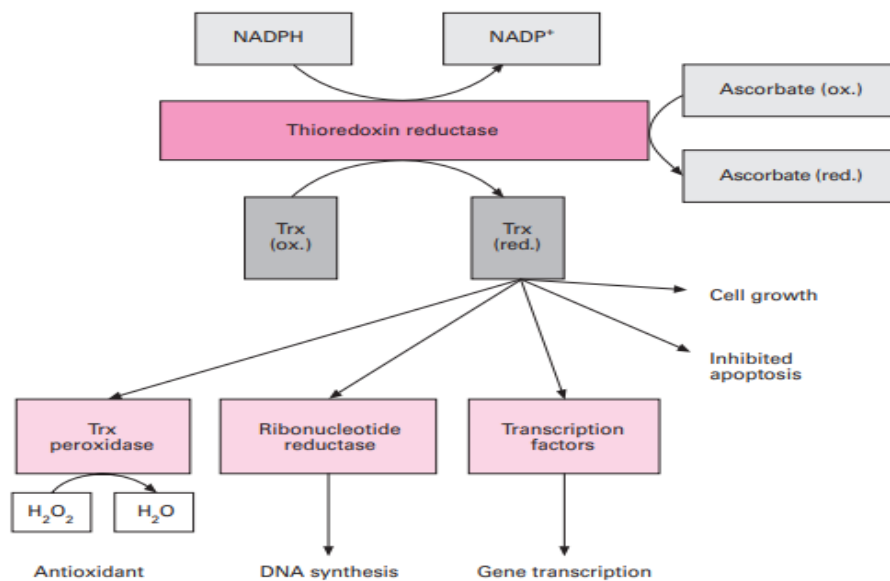
Postoji nekoliko studija o uzimanju selena kao dodatka prehrani kod Hashimotovog tireoiditisa uz uzimanje redovne terapije. Rezultati jedne studije pokazali su da je došlo do povećanja razine protutijela usmjerenih na anti-tiroidnu peroksidazu te se sugerira uzimanje selena u obliku dodatka prehrani u dozi od 200µg (Drutel i sur., 2013).



Slika 4. Kemijske reakcije katalizirane dejodaza enzimom (Tingjj, 2008)

Tioredoxin reduktaza sadrži selenocistein u svom aktivnom mjestu i provodi reakciju redukcije tioredoksina. Slika 5. prikazuje sustav tioredoksina i tioredoksin reduktaze koji je

uključen u razne oksidacijsko-redukcijske procese kojima se modulira intracelularna stanična signalizacija, inhibira apoptoza i regulira stanični rast. Tioredoksin u svom reduciranom obliku zajedno s tioredoksin reduktazom i NADPH djeluje kao sustav za reduciranje proteinskih disulfidnih veza pri čemu nastaju oksidirani spojevi s vodikom. Identificirane su tri tioredoksin reduktaze ovisno o lokaciji u organizmu; citosolna tioredoksin reduktaza, mitohondrijska tioredoksin reduktaza i tioredoksin/glutation reduktaza. Tioredoksin reduktaza također sudjeluje i u redukciji nedisulfidnih supstrata i u regeneraciji askorbinske kiseline iz njenih oksidiranih metabolita (Mustacich i Powis, 2000).



Slika 5. Funkcije tioredoksin reduktaze u organizmu ( Mustacich i Powis, 2000)

Selenoprotein P nalazi se u plazmi i primarna mu je funkcija prijenos selena krvlju. Za razliku od ostalih selenoproteina koji sadrže uglavnom jedan atom selena u obliku selenocisteina, SeP sadrži čak 10 atoma selena u obliku selenocisteina. Također ima antioksidativnu aktivnost jer štiti endotelne stanice od RNS, primjerice peroksinitrita koji ako se ne deaktivira može uzrokovati peroksidaciju lipida i oštećenja DNA (Saito i Takahashi, 2000). U našem organizmu postoje dva oblika selenofosfat sintetaze. Selenofosfat sintetaza I ne sadrži selenocistein i zadužena je za recikliranje selena iz selenocisteina, dok selenofosfat sintetaza II sadrži selenocistein i katalizira sintezu selenofosfata, prekursora selenocisteina potrebnog za sintezu selenoproteina, uz utrošak jedne molekule ATP-a. Selenofosfat je ključna molekula potrebna za sintezu drugih proteina koji sadrže selen (<http://definicijahrane.hr/mineralnetvari/selen-se/funkcije>).

## 1.2. Nanočestice

Danas postoji veliki interes za nanočestice i nanomaterijale ( 0.1 – 1000 nm) zahvaljujući njihovoj velikoj mogućnosti upotrebe u elektronici, optici, kemiji i razvoju lijekova. Nanočestice su dosad u istraživanjima pokazale antimikrobnu, antioksidativnu i antikancerogenu aktivnost. Neke od prednosti nanomaterijala su veća površinska aktivnost, velika specifična površina te katalitička svojstva. Navedena svojstva iskorištena su u farmaceutskoj industriji kako bi se povećala bioraspoloživost, topljivost i farmakokinetika lijekova. Svojstva nanočestica koriste se u ciljanoj dostavi lijeka do određenih dijelova tijela obzirom da se odabirom veličine čestice i njihovom površinom može optimirati aktivni i pasivni transport do ciljnih meta u tijelu (Zhang i sur., 2005).

Razlikujemo tri načina sinteze nanočestica; kemijskim, fizičkim ili biogenim putem. Biogena sinteza nanočestica podrazumijeva korištenje biomaterijala u samoj sintezi. Takav način sinteze je brz, jednostavno izvediv i ne iziskuje neke posebne uvjete tijekom same sinteze. Također nema upotrebe toksičnih kemikalija pa su nastale nanočestice prikladne za biološku primjenu jer nema rezidualnih ostataka (Kapur i sur., 2017).

Manje nanočestice imaju veću površinu i veći broj jedinica što može utjecati na nuspojave upotrebe nanočestica. Toksikološke studije pokazale su da nanočestice manje od 100 nm mogu uzrokovati respiratorne nuspojave i upale više nego veće čestice napravljene od istog materijala. Što je veća površina čestica veća je reaktivnost istih i mogućnost nastanka reaktivnih kisikovih spojeva što je i dokazano u in vitro uvjetima. Toksičnost nanočestica se može smanjiti stvaranjem veće koncentracije nanočestica jer se na taj način inducira stvaranje agregata čestica koji su veći od 100-200nm i koji imaju manji rizik toksičnosti.. Pritom bio – makromolekule mogu biti potencijalni biokatalizatori u proizvodnji različitih nanočestica. Također mogu djelovati kao bioreducirajući agensi, ali i kao stabilizatori za novo nastale nanočestice (Ingale i Chaudhari, 2013).

### 1.2.1. Biogena sinteza nanočestica selena

Srebrne nanočestice sintetizirane uz endofitičnu gljivu *Pestalotia* sp. pokazale su antibakterijsko djelovanje protiv ljudskih patogena *S. Aureus* i *S. Typhi*. Rade se i daljnja istraživanja nanočestica kao potencijalnih antimikrobnih agensa (Raheman i sur., 2011).

Za biogenu sintezu nanočestica selena Zhang i sur. (2004) koristili su selenatnu kiselinu kao polaznu sirovinu za dobivanje selena, a askorbinsku kiselinu kao reducens. Pritom su korišteni vodotopljivi polisaharidi; kitozan, glukomanan i karboksimetil celuloza koji su se

pokazali kao vrlo dobri stabilizatori kod sinteze nanoselena u otopini. Polisaharidi, biopolimeri iz biljaka i životinja, korišteni su zbog potencijalnog farmakološkog djelovanja. Kitozan male molekulske mase pokazuje imunomodulatorno i antibakterijsko djelovanje.

Dosad su u biogenim sintezama nanočestica selena korištene mnoge biljke kao primjerice aloe vera, ekstrakt grožda ili kora naranče. Vyas i Ahafkat (2017) sintetizirali su nanočestice selena uz aloe vera ekstrakt, vrlo dobar stabilizirajući agens kod novonastalih nanočestica. FRAP i DPPH metodom određen je antioksidativni potencijal nanočestica. Redukcijski potencijal nanočestica selena uz aloe ekstrakt bio je veći od redukcijskog potencijala samog aloe vera ekstrakta.

Sashidharan i sur. (2014) koristili su koru naranče u biogenoj sintezi česticana noselena koje su pokazale antimikrobnu aktivnost djelujući na stanice algi koje predstavljaju ekološki problem zbog pretjerane eutrofikacije.

### 1.3. Mandarina

Mandarina (lat. *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour) je trajnozeleno biljka koja naraste oko 2 do 3 m visine. Pripada porodici Rutvica (*Reticulata*), a rodu Citrusa. Biljka potječe iz Kine, a njen naziv od vladara mandarina, koji su to voće darivali u znak poštovanja. Plod je kriškasta bobica (hisperidij), a ovisno o sorti, narančaste je ili crvene boje. Sastoji se od mesnatog dijela (mezokarpa) i kore (perikarpa). Koru čine dva različito obojena dijela, epikarp (flavedo) i mezokarp (albedo). Mesnati dio ima 9-14 krišaka koje sadržavaju sok slatko-kiselog okusa i mirisa. Između kore i mesnatog dijela isprepliću se mrežaste niti zbog kojih je mandarina u sistematici smještena u porodicu agruma Rutvica (Dudaš i Ferenčić, 2016). Pulpa i kora mandarine, ali i citrusa općenito obiluje bioaktivnim komponentama od kojih su značajni fenolni spojevi; flavanoni, flavanon glikozidi i polimetoksilirani flavoni, jedinstveni za citruse i relativno rijetki kod drugih biljaka (Asami i sur., 2003).

Tablica 2. Kemijski sastav mandarine (USDA, 2018).

Nutrijenti	Mjerna jedinica	Količina u 100g
Energija	kcal	53,00
Proteini	g	1,32
Masti	g	0,00
Ugljikohidrati	g	13,16
Vlakna	g	1,30
Kalcij	mg	26,00
Kalij	mg	164,00
Vitamin A	IU	658,00
Vitamin C	mg	27,60

## **1.4. Fenolni spojevi**

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji nastaju kao odgovor na biotički i abiotički stres u biljkama. Biološki su aktivni spojevi koji služe biljkama kao zaštita od različitih stresnih čimbenika kao što su UV zračenje i napadi patogena. Utječu na otpornost biljaka prema bolestima i različitim mikroorganizmima, rast i razmnožavanje, kao i na senzorske osobine, aromu, boju i okus biljnih plodova i proizvoda biljnog porijekla. Način djelovanja fenolnih spojeva povezan je sa mehanizmom zaštite i popravka DNA, inhibicijom kancerogenih tvari i diferencijacijom stanica pa fenolni spojevi imaju važnu ulogu u liječenju i prevenciji bolesti povezanih sa oksidacijskim stresom, kao što su rak, dijabetes te različitih neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti. Osim toga, uočena je i njihova antibakterijska, protupalna i protualergena aktivnost (Agati i sur. 2012).

Fenolni spojevi se dijele u nekoliko velikih skupina: fenolne kiseline, flavonoide, lignane, stilbene i druge fenole (Rasoli, 2011).

### **1.4.1. Fenolne kiseline**

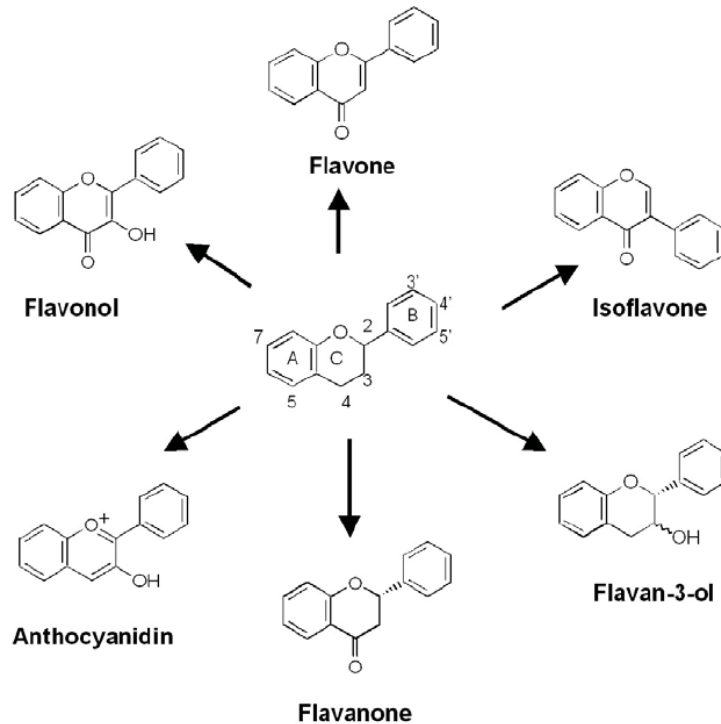
Razlikuju se dvije osnovne skupine fenolnih kiselina: derivati hidroksicimetne kiseline i derivati hidroksibenzojeve kiseline (Rasoli, 2011).

Derivati hidroksicimetne kiseline u biljkama su puno češći, a to su uglavnom o- i p-kumarinska, kafeinska i ferulična kiselina. Obično su glikozilirane, a najviše ih ima u borovnicama, kiviju, šljivama, višnjama i jabukama. Nasuprot tome, derivati hidroksibenzojeve kiseline obično se nalaze u relativno niskim koncentracijama u jestivim biljkama, osim u određenom crvenom voću i luku. Najčešći derivati su vanilinska, galna, m- i p-hidroksibenzojeva kiselina. Od navedenih fenolnih kiselina u kori mandarine u najvećem udjelu su pronađene: galna, vanilinska, ferulična, p-kumarinska i p-hidroksibenzojeva kiselina (Hayat i sur., 2010).

### **1.4.2. Flavonoidi**

Flavonoidi su prepoznatljivi po flavanskoj jezgri građenoj od dva aromatična prstena povezana piranskim prstenom. Struktura od tri prstena ( $C_3-C_6-C_3$ ) koja može biti u različitim varijacijama, te supstitucija na C15 čini razliku između flavona, flavanona, flavonola, flavan-3-ola, izoflavona te antocijana. U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku

glikozida, povezani s različitim šećerima. Osim šećera, na osnovnoj jezgri mogu se još nalaziti hidroksilne i metilne grupe (Nishiumi i sur., 2011). Bogati izvori flavonoida su voće i povrće, zeleni i crni čaj, čokolada, crna vina i bobičasto voće. Značajne količine se nalaze u cvijeću, sjemenkama, medu i propolisu (<http://tehnologijahrane/enciklopedija/biljni-pigmenti>).



Slika 6. Osnovna struktura flavonoida i glavne podskupine (Nishiumi i sur., 2011)

Pojedine podskupine flavonoida utječu na smanjenje rizika oboljevanja od različitih vrsta tumora. Tako katehini i flavonoli smanjuju rizik raka prostate, epikatehini rak dojke, proantocijanidini mogu smanjiti rizik oboljevanja od raka pluća, a flavoni su vezani uz manju pojavnost kolonorektalnog karcinoma (Rodriguez-Garcia i sur., 2019).

Metaboliti polifenola se vrlo brzo eliminiraju iz plazme što indicira važnost svakodnevnog unosa povrća i voća bogatih polifenolima kako bi se visoke koncentracije metabolita održale u plazmi. Proantocijanidi se najmanje apsorbiraju. Flavonoli, flavoni i flavanoli također imaju vrlo nisku koncentraciju u krvi, prosječno 1 mol/L zbog ograničene apsorpcije ali i vrlo brze eliminacije. Flavanoni i izoflavoni su flavonoidi s najboljim profilom bioraspoloživosti i njihova koncentracija u plazmi može dosegnuti vrijednost od 5 mol/L (Manach i sur., 2004).

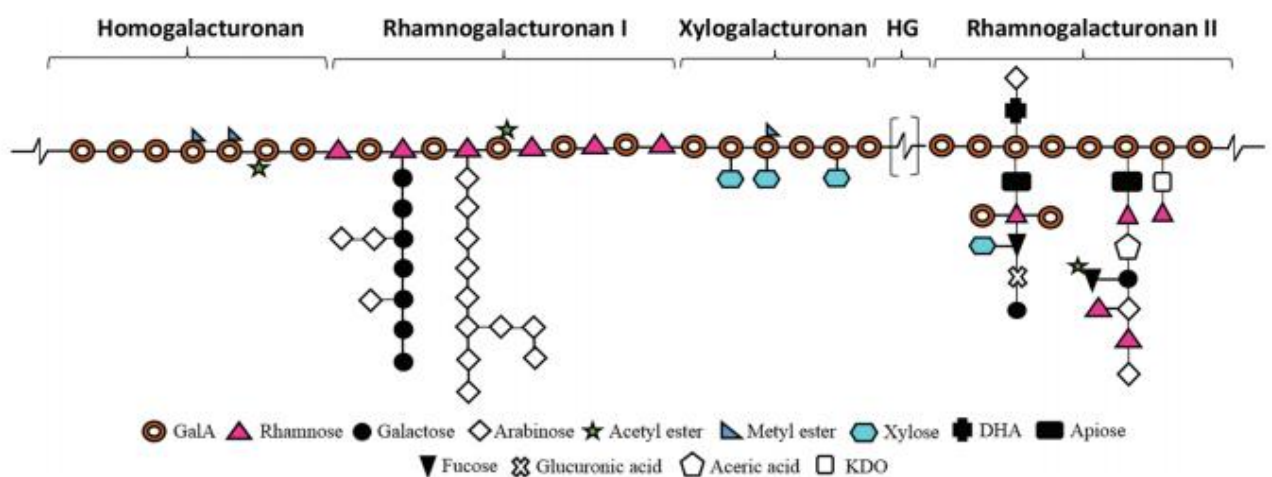
Flavonoida je najviše u bijelom dijelu kore (albedo). Antocijani i flavanoni se od svih podskupina flavonoida najviše zastupljeni u citrusnom voću. Neki od flavonoida koji su specifični za citruse su polimetoksilirani flavoni, nobiletin i tangeretin (Hishiumi i sur., 2011). Nobiletin je flavonoid prisutan u kori mandarine koji ima snažno antioksidacijsko djelovanje

te neposredno utječe na sniženje nakupljanja masti u jetri, smanjuje upalne procese i pomaže u prevenciji srčanih bolesti. Jedno istraživanje potvrdilo je učinkovitost nobilitena istraživanjima na dvije skupine miševa. Prvu skupinu hranili su velikim postotkom masti i jednostavnim šećerima te su dobili na masi, povišen kolesterol, trigliceride i glukozu u krvi. Druga skupina koja je dobivala nobiliten uz hranu nije razvila metabolički sindrom. Osim nobilitena vrlo zastupljen flavonoid u kori mandarina je hisperidin (flavanon). Njegova učinkovitost najbolje se dokazala u liječenju hemoroida i proširenih vena (Mulvihill i sur., 2011).

### 1.5. Pektini

Pektini su heterogena skupina strukturnih biljnih polisaharida sastavljena većinom od galakturonske kiseline (GalA) koja je povezana  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidnim vezama u polisaharidni lanac. U manjim udjelima pektin sadrži homogalakturonan, rhamnogalakturonan i ostale supstituirane galakturonane. Ime pektina potječe od grčke riječi "pektos" ( $\pi\eta\kappa\tau\acute{o}\varsigma$ ), što u prijevodu znači „želiran“, „ukrućen“ (Leclere i sur., 2013).

Pektini su prisutni kao strukturni polisaharidi u središnjoj lameli i primarnoj staničnoj stijenci viših biljaka. Najvažnije fizikalno-kemijsko svojstvo pektina koje ga čini važnom komponentom hrane i farmaceutskih proizvoda je njegova sposobnost tvorbe gela. Topljivost pektina u vodenim medijima najviše ovisi o temperaturi, pH-vrijednosti te ionskoj jakosti. Pektin se kao sredstvo za želiranje koristi u proizvodnji voćnih marmelada, želea, džemova i sličnih proizvoda (<http://tehnologijahrane.hr/hidrokoloidi-i-pektinske-supstance>).



Slika 7. Strukturne podjedinice pektina (Gullon i sur., 2013)

Slika 7. prikazuje manje podjedinice pektina koje se razlikuju u molekulskoj masi, nabijenosti, udjelu galakturonske kiseline, udjelu ferulične kiseline i ostalih fenolnih komponenti koje su sastavni dio strukture. Različite podjedinice koje nastaju razgradnjom pektina stimuliraju rast različitih bakterija mikrobiote (Gullon i sur., 2013).

Pektin je neprobavljiv u gornjem gastrointestinalnom traktu. Djelomično ga razgrađuju bakterije u kolonu u anaerobnim uvjetima te proizvode kratkolančane masne kiseline (short chain fatty acids, SCFAs) koje predstavljaju glavni izvor energije kolonocitima. Primjer su maslačna, propionatna i acetatna kiselina. Smanjena količina ovih metabolita može nepovoljno utjecati na crijevni trakt, te pogodovati patogenim procesima oštećenja crijevnih sluznica, nastanku kolitisa ili čak raka debelog crijeva. Ovaj mehanizam zaštitnog djelovanja kratkolančanih masnih kiselina, prvenstveno maslačne kiseline, podrazumijeva ireverzibilno poboljšanje imunogenih svojstava kolonocita (Guillon i Champ, 2000).

Poznato je da pektini smanjuju koncentraciju serumskog kolesterola na način da sprječavaju reasorpciju žučnih soli u enterohepatičku cirkulaciju i povećavaju njihovo izlučivanje. Utječu i na glikemijski odgovor, odnosno na smanjenje proizvodnje inzulina što opet rezultira smanjenom sintezom kolesterola u jetri. Polisaharidi poput pektina mogu biti uključeni u staničnu signalizaciju hormona crijeva koji su vezani uz glad (glukagon) ili sitost (peptid sličan glukagonu) (Kim i Wicker, 2013).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Antioksidativna i antikancerogena svojstva nanoselena vrlo se intenzivno istražuju. Također se istražuje potencijalno korištenje ekstrakata iz različitih biljnih vrsta u biogenoj sintezi nanoselena. Polifenoli, vitamini i minerali iz biljnih ekstrakata mogu potpomognuti sintezu nanoselena te mijenjati svojstva nastalih nanočestica; potencijalno u smjeru povećanja biološke učinkovitosti. Važan izvor bioaktivnih spojeva sa reduktivnom učinkovitošću ili potencijalno za oblaganje je i otpad prehrambene industrije. Kora mandarine bogata je polifenolima i pektinima te je potencijalno vrijedna sirovina koja bi se mogla iskoristiti u sintezi nanoselena. Takvim iskorištavanjem kore mandarine istovremeno se smanjuje opterećenje za okoliš.

Cilj ovog eksperimentalnog rada jest istražiti mogućnost korištenja ekstrakata iz kore mandarine u biogenoj sintezi nanoselena te istražiti na koji način takva biogena sinteza utječe na svojstva nastalih nanosustava, primarno raspodjelu veličina čestica, zeta potencijal, stabilnost nastalog nanosustava te antioksidacijski kapacitet.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Kemikalije i pribor**

- Limunska kiselina(Sigma-Aldrich, SAD)
- Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 96% (Grammol, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- Bezvodni Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lach-Ner, Češka)
- Ultračista voda (MiliQ H<sub>2</sub>O)
- Falcon kivete
- Tikvice s okruglim dnom
- Eppendorf kivete
- Mikropipete
- Multikanalna pipeta
- Buchnerov lijevak

##### **3.1.2. Radni materijali i oprema**

- Analitička vaga, Metler Toledo AB265S
- UV-VIS spektrometar UV 4-100 ( ATI Unicam, Cambridge, Velika Britanija )
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L (UZUSIO, Tokyo, Japan)
- Soxhlet aparatura ( Inko , Zagreb, Hrvatska)
- Termostatirana kupelj s mućkalicom, tip 1086 ( Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka)
- Rotavapor (Buchi , Švicarska)

- Vodena kupelj ( GFL 1086 , Helago, Češka)
- Termostat ( Inko, Zagreb, Hrvatska)
- Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija)

### **3.1.3. Plan eksperimentalnog rada**

- Odmašćivanje mljevene kore mandarine
- Ekstrakcija polifenola iz odmašćene komine
- Ekstrakcija pektina iz odmašćene komine
- Liofilizacija dobivenih ekstrakata polifenola i pektina
- Korištenje suhih ekstrakata polifenola i pektina u biogenoj sintezi nanoSe
- Određivanje antioksidacijskog potencijala nanoSe
- Određivanje raspodjele veličine i zeta potencijala čestica nanoSe

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema uzorka kore mandarine**

Kora masline usitnjena je i sušena 72 h na 60 °C. Nakon sušenja usitnjena je u mlinu i prosijana kroz sito promjera 0.9 mm. Tako osušen uzorak odmašćen je pomoću Soxhlet uređaja korištenjem petroletera kao ekstrakcijskog sredstva. Kraj ekstrakcije određen je provođenjem testa masne mrlje.

### **3.2.2. Ekstrakcija polifenola**

Ekstrakcija polifenola provodila se prema postupku opisanom u radu Li i suradnika(2006). 10 g odmašćene komine ekstrahirano je sa 100 mL 85% etanola 3 h na temperaturi od 85 °C. Prilikom ekstrakcije Erlenmayerova tikvica je zatvorena alu-folijom te se u par navrata nadopunjavala otapalom kako bi volumen otapala bio stalan. Po završetku ekstrakcije reakcijska smjesa profiltrirana je pomoću vakuuma preko sinter-lijevka. Alkoholna faza ekstrakta uparena je na rotavaporu do otprilike 15% početnog volumena, a vodeni ostatak osušen je procesom liofilizacije u trajanju od 48h. Tako dobiveni suhi ekstrakt polifenola kore mandarine koristi se u biogenoj sintezi nanoSe.

### 3.2.3. Ekstrakcija pektina

Ekstrakcija pektina iz kore mandarine provedena je prema postupku Casas-Orozco i suradnika (2015) uz manje modifikacije. 1% limunska kiselina pripravljena je otapanjem 5g limunske kiseline u 5ml vode, a zatim je polaganim dodavanjem 5M HCl-a pH kiseline podešen na 1.5. Bilo je potrebno nekoliko kapi HCl-a za podešavanje pH vrijednosti.

10 g komine ekstrahirano je sa 200 mL 1% limunske kiseline (pH=1.5) 1.5 h na 85 °C. Ekstrakcija se provodila u Erlenmayerovoj tikvici, zatvorenoj alu-folijom uz konstantno protresanje. Na završetku ekstrakcije smjesa se filtrira kroz običan filter papir. Dobiveni filtrat dodaje se u dvostruku količinu 96% etanola kako bi se pektin istaložio. Nakon 1h taloženja na 4 °C istaloženi pektin se izdvaja iz smjese vakuum filtracijom te naknadnim centrifugiranjem u trajanju od 20min pri 39000rcf. Dobiveni pektin podijelio se na dva jednaka dijela - pročišćeni pektin koji se suši, i drugi dio koji se dodatno ispiri 63% etanolom pomoću vakuum filtracije sve dok se ne dobije pročišćeni, bijeli pektin. Dobiveni pektin suši se na 40 °C u sušioniku 24h, i tako prosušen koristi se u biogenim sintezama nanoSe.

### 3.2.4. Sinteza nanoselena

Princip sinteze nanočestica selena jest redukcija natrijevog selenita,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  uz reducens, L-askorbinsku kiselinu u elementarni selen. Prilikom sinteze nastaje crvena boja specifična za elementarni selen koji se taloži na dnu epruvete. Pritom su u biogenoj sintezi korišteni pročišćeni, odnosno nepročišćeni pektini kao prirodna sredstva za oblaganje te polifenoli ekstrahirani iz komine mandarine kao reducensi i/ili sredstva za oblaganje. U kemijskoj sintezi nanoselena korištena L-askorbinska kiselina kao reducens i polivinilpirolidon kao sredstvo za oblaganje.

Metoda sinteze temelji se na sljedećoj kemijskoj reakciji:



#### 3.2.4.1. Izrada kemikalija i reagensa

- Polivinilpirolidon (1%) - pripravljena je otopina koncentracije 10mg/1ml otapanjem polivinilpirolidona u miliQ vodi.
- Čisti pektin (PP) (1%) – pripravljena je otopina čistog pektina otapanjem 0.1g pročišćenog pektina u 10ml vode.

- L-askorbinska kiselina (0.1M) – pripravljena je otopina koncentracije 1.762g/100ml otapanjem L-askorbinske u vodi.
- Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>(0.1M) – pripravljena je otopina koncentracije 172.9mg/10ml otapanjem natrijeva selenita u vodi.

### 3.2.4.2. Postupak biogene sinteze nanoSe

Reakcijska smjesa priprema se miješanjem L-askorbinske kiseline, vodete ekstrakt polifenola ili pektina u određenim volumenima(kako je prikazano u Tablici 3). Smjesa se postavi na magnetsku miješalicu uz magnetski mješač i brzinu miješanja 3. U smjesu se postupno dodaje kap po kap 1ml Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> uz vidljivu promjenu boje u crvenu. Nakon 20 min miješanja, smjesa se prebacuje u kivete za centrifugiranje (8000g, 20min, 4°C). Supernatant se odlije, a istaložene nanočestice dodatno se pročisti sa 10ml miliQ vode. Nakon centrifuge, supernatant se dekantira a talog se redispergira u 5ml miliQ vode i koristi za daljnja istraživanja.

### 3.2.4.3. Postupak kemijske sinteze kontrolne otopine nanoSe

Kemijska sinteza nano Se provodi se na isti način kao biogena, osim što reakcijsku smjesu čini 10ml L-askorbinske, 9ml PVP-a i 9 ml miliQ vode. Potpun sastav reakcijskih smjesa prikazan je u Tablici 3. U uzorak 8 dodani su polifenoli bez PVP-a. U dobivenom uzorku nije nastao nanosustav, već se elementarni selen nataložio na dnu epruveta. Obzirom da nije formiran nanosustav uzorak nije korišten u daljnjim analizama. Uzorak 6 dobiven je kemijskom sintezom i on predstavlja referentnu otopinu.

Tablica 3. Sadržaj reakcijskih smjesa

UZORAK	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	L-ASK. KISELINA	ČISTI PEKTIN (ml)	NEPOČIŠĆENI PEKTIN(mg)	PVP(ml)	POLIFENOLNI EKSTRAKT(mg)	H <sub>2</sub> O <sub>DEM</sub>	V <sub>TOT</sub>	W <sub>COATING</sub> (%)
1	1	10	3	/	/	/	15	29	0.35
2	1	10	7	/	/	/	11	29	0.7
3	1	10	/	29	/	/	18	29	0.1
4	1	10	/	90	/	/	18	29	0.3
5	1	10	/	200	/	/	18	29	0.7
6	1	10	/	/	9	/	9	29	0.3
7	1	10	2	/	9	2	7	29	0.3
8*	1	10	2	/	/	2	16	29	0

### 3.2.5. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom

Redukcijski potencijal nanoSe određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom. Folin-Ciocalteu metoda temelji se na prijelazu elektrona u alkalnom mediju sa fenola i drugih redukativnih tvari iz uzorka koje imaju antioksidacijski potencijal (npr. askorbinska kiselina, aromatskiamini) na fosfovolframate i fosfomolibdate iz Folin-Ciocalteu reagensa koji je žuto obojen. Pritom nastaju plavo obojeni W (VI) i Mo (VI) kompleksi nepoznate strukture te žuta boja nestaje, a pojavljuje se plava. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 725 nm. Udio redukativnih spojeva u uzorku proporcionalan je intenzitetu nastalog obojenja (Ainsworth i Gillespie, 2007).

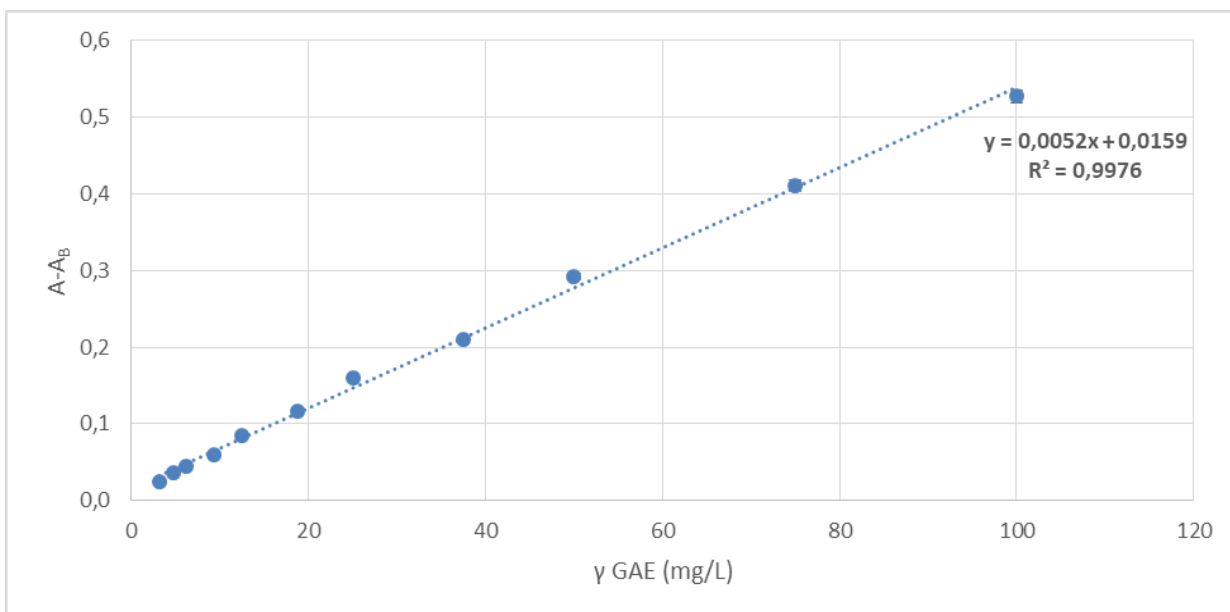
#### 3.2.5.1. Priprema reagensa

- Folin-Ciocalteu reagens (10%) – 500  $\mu$ m Folin-Ciocalteu reagensa razrijedi se u 4500  $\mu$ m vode.
- Otopina  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 3,015g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se otopi u 50ml vode.
- Standardna otopina galne kiseline

Ishodna otopina galne kiseline koncentracije 4 mg/mL izrađuje se otapanjem 400 mg galne kiseline u 10 mL etanola i nadopunjavanjem do 100 mL sa destiliranom vodom – dobije se ishodna otopina 1 (IO1). Ishodna otopina galne kiseline koncentracije 0.4 mg/mL izrađuje se razrjeđivanjem ishodne otopine 1 (IO1) 10 puta (10 mL razrijediti na 100 mL destiliranom vodom) - dobije se ishodna otopina 2 (IO2).

Izrada baždarnog dijagrama:

Radne otopine izrađuju se razrjeđivanjem destiliranom vodom različitih volumena ishodne otopine 2 (0.25, 0.50, 0.75, 1.25, 1.75, 2.50, 3.00, 3.75) mL na 10 mL. Od svake otopine poznate koncentracije galne kiseline pripremi se mjerna otopina te se mjeri apsorbancija na 725 nm. Dobivene vrijednosti koriste se za izradu baždarnog dijagrama (Slika 8).



Slika 8. Baždarni dijagram za određivanje ukupnog redukcijskog potencijala uzorka izraženog kao ekvivalenti galne kiseline (GAE)

### 3.2.5.2. Postupak:

20  $\mu\text{L}$  uzorka (ili vode koja predstavlja slijepu probu) stavi se mikropipetomu jažice mikrotitarske ploče. Svaki uzorak pipetira se u kvadriplikatu. U svaku jažicu doda se 50  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reagensa. Ploča s uzorcima stavi se na miješanje 60 sekundi, a zatim na inkubaciju na 37 °C u trajanju od 210 sekundi. Nastavno se doda 160  $\mu\text{L}$  3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , smjesa semiješa 60 sekundi te se nakon inkubacije od 1710 sekundi očita apsorbancija na 750nm. Pomoću baždarnog dijagrama (ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline) izračuna se redukcijski potencijal uzorka, a rezultati se izraze kao ekvivalenti galne kiseline.

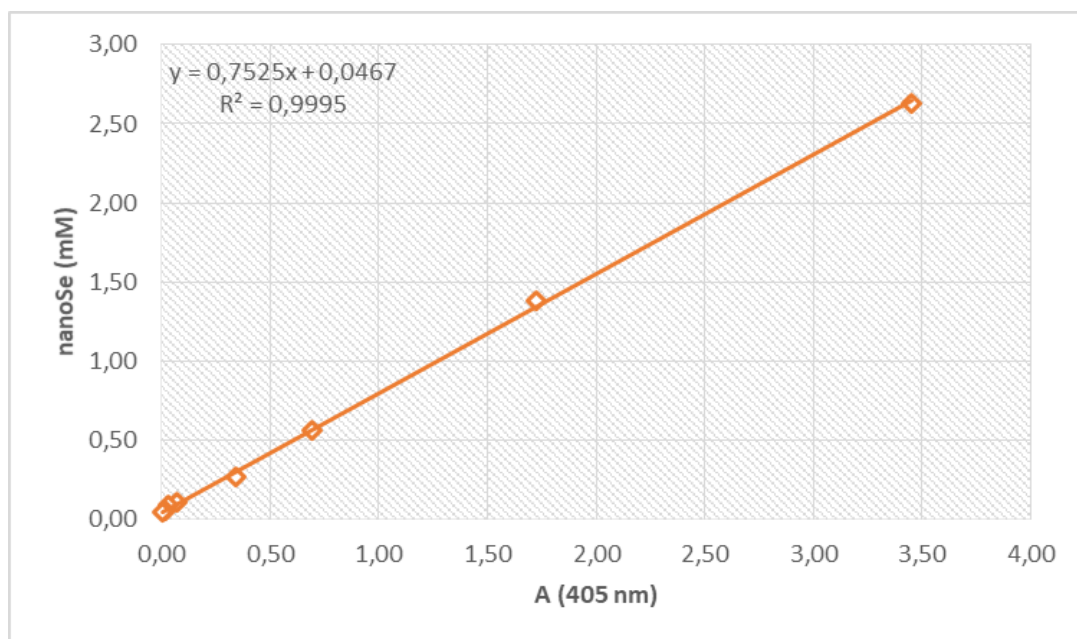
### 3.2.6. Određivanje koncentracije selena

Koncentracija nanoSe u uzorcima 1-7 (Tablica 3) određena je spektrofotometrijski. Prilikom mjerenja apsorbancije uzorak se provede u stanje slobodnog atoma procesom atomizacije jer slobodni atomi apsorbiraju energiju zračenja određenih valnih duljina koje se odvajaju monokromatorom te se na kraju detektorom pretvaraju u mjerni signal koji se očitava. UV spektroskopija slijedi Beer Lambertov zakon. Monokromatsko svjetlo prolazi kroz otopinu koja sadrži supstance koje imaju sposobnost apsorpcije te se intenzitet svjetlosti smanjuje proporcionalno koncentraciji otopine.

U svrhu spektrofotometrijskog određivanja koncentracije nanoSe najprije jekorištenjem otopina poznatih koncentracija nanoSe napravljenabaždarna krivulja koja pokazuje ovisnost apsorbancije uzoraka (405 nm) o koncentraciji nanočestica selena (*Tablica 4; Slika 9*). Utvrđena je linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji nanoSe u otopini te je jednadžba pravca korištena zaodređivanje koncentracije nanoSe u analiziranim uzorcima.

*Tablica 4.* Otopine selena različitih koncentracija za izradu baždarnog dijagrama

c(Se) mM	razrjeđenje	A (405nm)
3.45	1x	2.630
1.725	2x	1.379
0.69	5x	0.560
0.345	10x	0.273
0.069	50x	0.106
0.0345	100x	0.095
0.01725	200x	0.055
0.0069	500x	0.045

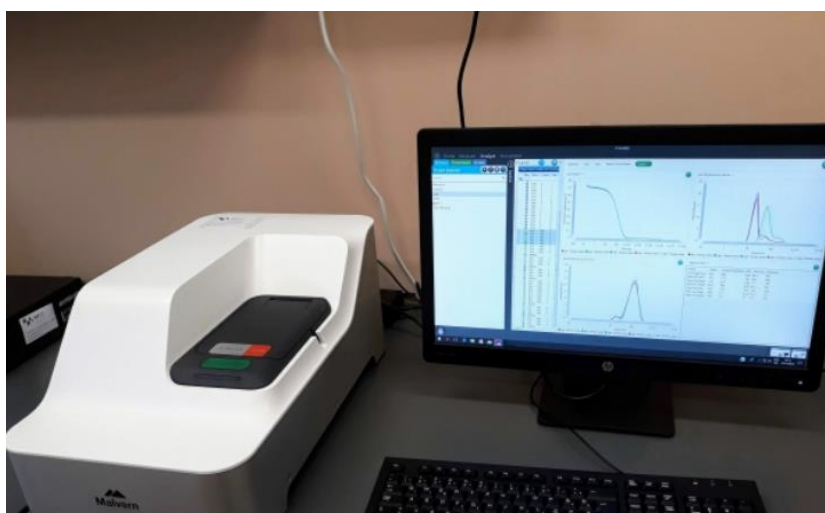


*Slika 9.* Ovisnost apsorbancije (405 nm) o koncentraciji nanoSe u suspenziji

### 3.2.7. Određivanje zeta potencijala i raspodjele veličine čestica



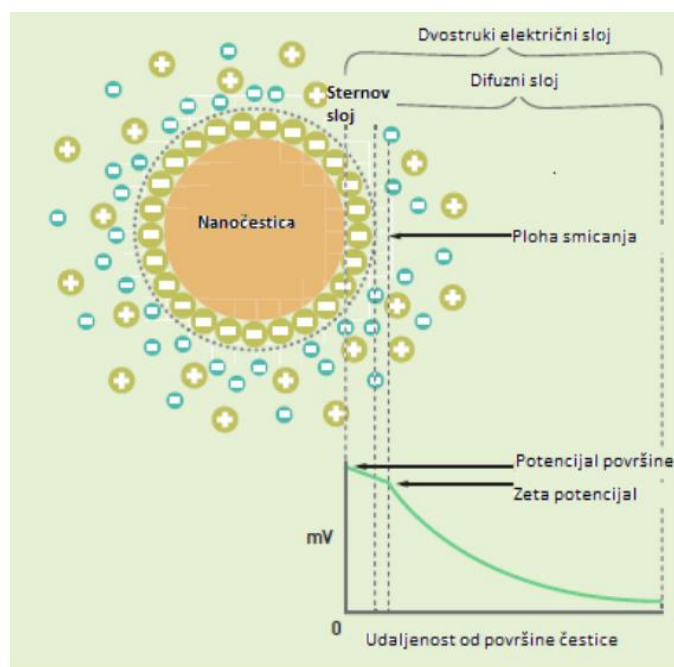
Za određivanje zeta potencijala i raspodjele veličine čestica korišten je uređaj Zetasizer Ultra primjenom metode analize dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti. Mjerno područje veličina čestica iznosilo je 0,3 nm – 10 µm, a kod određivanja zeta potencijala nisu definirana ograničenja. Zeta potencijal može se mjeriti u vodenom i organskom mediju. Zeta potencijal čestica i molekula određuje se mjerenjem njihove brzine kretanja između elektroda pod utjecajem električnog polja, a navedena pojava naziva se elektroforeza. Brzina kojom se čestice kreću proporcionalna je jačini električnog polja, odnosno vrijednosti zeta potencijala ([www.irb.hr/Istrazivanja/Kapitalna-oprema/Malvern-Zetasier-Nano-ZS](http://www.irb.hr/Istrazivanja/Kapitalna-oprema/Malvern-Zetasier-Nano-ZS)).



*Slika 10.* Uređaj Zetasizer Ultra korišten za određivanje raspodjele veličine čestica nanoSe i zeta potencijala

### **3.2.7.1. Određivanje zeta potencijala**

Elektrostatski potencijal čestica ili molekula u određenom mediju naziva se zeta potencijal te on proizlazi iz površinskog naboja, koncentracije i vrste iona u otopini. Što je veći naboj na površini čestica, to je veća stabilnost uzorka, odnosno manja je mogućnost flokulacije i agregacije čestica. Korištenjem surfaktanata i različitih elektrolita regulira se stabilnost tako što se mijenja pH, ionska koncentracija te vrste iona. Poznavanje zeta potencijala čestica važno je kod odabira formulacije kako bi se odabrao prikladan materijal koji osigurava stabilnost i povećava rok trajanja preparata ([www.malvernpanalytical.com/en/products/measurment-type/zeta-potential](http://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurment-type/zeta-potential)).



*Slika 11.* Shematski prikaze zeta potencijala (<http://malvern/zetapotential/>)

Slika 11 prikazuje ovisnost promjene potencijala o udaljenosti od površine čestice. Potencijal ima najvišu vrijednost na površini čestice te potom naglo opada (Sternov sloj), a zatim se eksponencijalno smanjuje (Gouy-Champmanov sloj).

Za određivanje zeta potencijala, odnosno stabilnosti samih uzoraka uzorci su razrijeđeni vodom u omjeru 1:1 te dobro izmiješani na vortexu. Sama analiza u Zetasizer uređaju traje 3 minute.

### 3.2.7.2. Određivanje raspodjele veličine čestica

Veličina čestica se izražava kao promjer sfere koja difundira jednakom brzinom kao i mjerena čestica. Čestice i molekule koje su u konstantnom termičkom kretanju difundiraju brzinom ovisnoj o njihovoj veličini.

Nakon pripreme taložnih sustava, alikvot od 1 mL prenesen je u kivetu za mjerenje dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). Raspodjela veličine čestica određena je pomoću Zetasizer uređaja opremljenog zelenim laserom (532 nm). Mjerenje svakog uzorka je ponovljeno 3 puta. Kao hidrodinamički promjer uzeta je vrijednost u maksimuma pikova dobivenih u raspodjeli po volumenu.

### 3.2.7.3 Statistička obrada podataka

Za statističku analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišteni su Microsoft Office Excel i GraphPad Prism 8.0 programi. Sinteze nanoselena (izuzev kontrolne otopine selena) provedene su u duplikatu, analize raspodjele veličine čestica i zeta potencijala rađene su u šesteroplikatu, a antioksidacijski potencijal određen je u triplikatu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne i relativne standardne devijacije. Za usporedbu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance uz *post hoc* Tukey-ev test. Uzorci su značajno statistički različiti ako je  $p < 0.05$ .

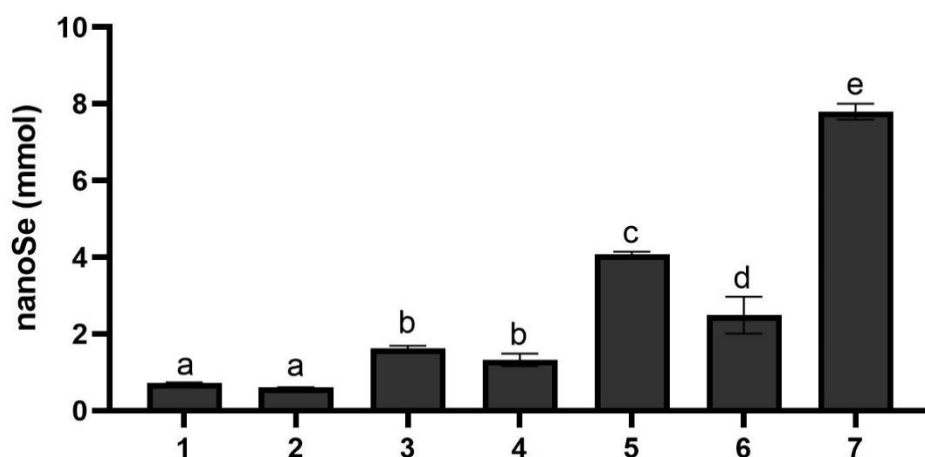
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Određivanje koncentracije nanočestica seleno u uzorcima

Koncentracija nanoselena određena je mjerenjem apsorbancije otopina nanoSe na 405 nm. Naime, nanoSe zbog svoje karakteristične crvene boje apsorbira u vidljivom dijelu spektra, a vrijednost apsorbancije linearno je ovisna o koncentraciji nanoselena u otopini (Slika 9). Ovaj je korak nužan obzirom da su formulacije nanoSe nakon sinteze čišćene postupkom centrifuge, gdje se nečistoće prisutne u reakcijskoj smjesi uklanjaju jednostavnim dekantiranjem supernatanta nakon centrifuge (kako je opisano u poglavlju 3.2.4. Sintaza nanoselena). Na taj način u svakom koraku čišćenja izgubi se i dio nanoSe te količine značajno variraju od uzorka do uzorka. Također, razlike u količini nanoselena u pojedinim uzorcima dijelom su posljedica različitog redukcijskog potencijala reakcijske smjese. Stoga je za usporedbu antioksidacijskog potencijala dobivenih nanosuspenzija nužno rezultate iskazati na količinu nanoselena u uzorku.

Tablica 5. Koncentracije sintetiziranog nanoSe u uzorcima

Uzorak	$\mu\text{m(Se)/ml}$	St. dev.	RSD
1	0.720	0.021	2.981
2	0.612	0.004	0.780
3	1.617	0.076	4.701
4	1.326	0.162	12.197
5	4.072	0.071	1.741
6	2.493	0.480	19.253
7	7.796	0.205	2.634

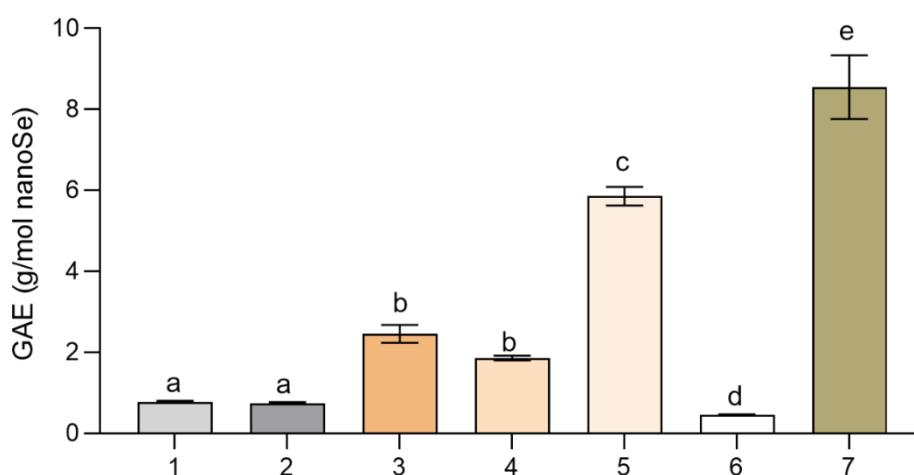


Slika 12. Koncentracije nanoSe u analiziranim uzorcima

1-uzorak sa čistim pektinom 0.35%; 2-uzorak sa čistim pektinom 0.7%; 3-uzorak sa sirovim pektinom 0.1%; 4-uzorak sa sirovim pektinom 0.3%; 5-uzorak sa sirovim pektinom 0.7%; 6-referentni uzorak; 7-uzorak sa polifenolima i čistim pektinom (0,3%). Stupići označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

Analiza varijance i *post-hoc* Tukey-ev test (Slika 12) pokazali su da analizirani uzorci sadrže značajno različite koncentracije nanoSe koje su se kretale od 0.612 mmol/L (uzorak 2) do 7.796 mmol/L (uzorak 7) (Tablica 5). Iako su opažene razlike dijelom uvjetovane postupkom čišćenja, bitno je primjetiti da su najveće količine nanoselena određene u uzorku kojem je dodan i pektin i ekstrakt polifenola što je vjerojatno rezultiralo povećanim redukcijskim kapacitetom reakcijske smjese i značajnijom redukcijom selenita u elementarni selen.

#### 4.2. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom



Slika 13. Reduktivna sposobnost nanoSe

1-uzorak sa čistim pektinom 0.35%; 2-uzorak sa čistim pektinom 0.7%; 3-uzorak sa sirovim pektinom 0.1%; 4-uzorak sa sirovim pektinom 0.3%; 5-uzorak sa sirovim pektinom 0.7%; 6-referentni uzorak; 7-uzorak sa polifenolima i čistim pektinom (0,3%). GAE- ekvivalenti galne kiseline. Stupići označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

Cilj istraživanja reduktivne sposobnosti uzoraka nanoSe bio je istražiti da li je korištenjem ekstrakata dobivenih iz komine mandarine moguće sintetizirati nanočestice zadovoljavajućih morfoloških karakteristika i stabilnosti koje će pokazivati i reduktivnu sposobnost. Naime, iako je Se poznati antioksidans, on nema sposobnost direktne redukcije reaktivnih

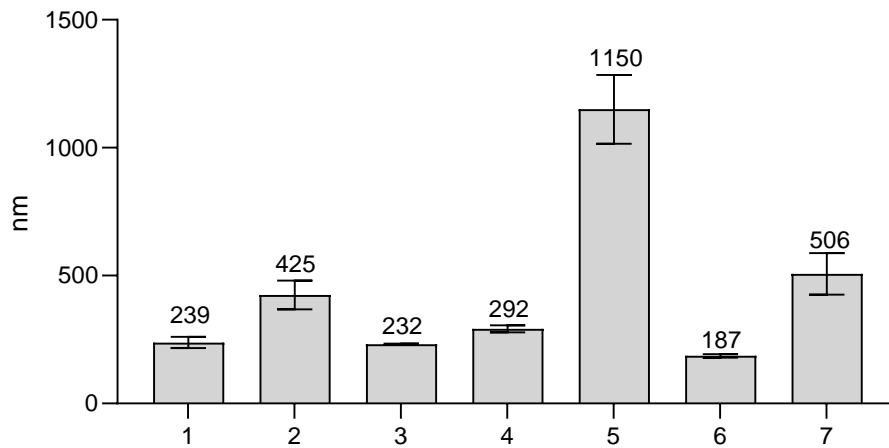
kisikovih/dušikovih spojeva već svoje učinke ostvaruje *in vivo* kao dio selenoproteina koji sudjeluju u obrani organizma od oksidacijskog stresa. Hipotetski, korištenje sirove pektinske frakcije koja sadrži značajnije količine polifenola mogla bi doprinijeti takvom učinku. Naime iako antioksidativna aktivnost pektina iz kore mandarine nije istraživana, radovi drugih autora pokazuju da slični pektini, izolirani iz kore naranče pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost (Quadir et al., 2019). Adsorpcija tvari s redukcijskim potencijalom doprinijela bi poboljšanoj reduktivne sposobnosti u odnosu na kemijski sintetizirani nanoSe.

Rezultati provedenih istraživanja prikazani su na slici 13. U skladu s našim očekivanjima vrijednosti redukcijskog potencijala uzoraka kretale su se od 0.46gGAE/molSe (kemijski sintetizirani nanoselen) do najviše 8.55 gGAE/molSe (u uzorku sintetiziranom kombinacijom čistog pektina i polifenolnog ekstrakta kore mandarine). Iz prikaza rezultata vidljivo je da je značajno povećanje redukcijskog potencijala u odnosu na referentni uzorak (uzorak 6) postignuto u svim analiziranim uzorcima, a osobito primjenom sirovog pektina kao inkapsulacijskog sredstva u masenom udjelu od 0.7% (5.86 g GAE/molSe) te osobito kombinacijom čistog pektina (0.3%) i ekstrakta polifenola iz kore mandarine (8.85gGAE/mol nanoSe). Iako korištenje sirove pektinske frakcije rezultira značajnim povećanjem reduktivnog potencijala uzoraka, povećanjem njegovog masenog udjela u reakcijskoj smjesi ne postiže se povećanje antioksidativnog potencijala uzoraka. Korištenjem pročišćene pektinske frakcije ostvaren je vrlo mali (iako statistički značajan) porast antioksidativnog potencijala uzoraka. Ovakvi rezultati u skladu su s našim očekivanjima obzirom da se u postupku čišćenja iz pektinske frakcije uklanja većina prirodno prisutnih polifenola što rezultira gubitkom antioksidativnog učinka. Naime, uobičajeni način ekstrakcije pektina jest ekstrakcija pri povišenoj temperaturi (60–100°C) u kiselim uvjetima pH 1.5-3 kroz nekoliko sati (Koubala i sur., 2008). Dodatnom precipitacijom pektina etanolom uklanjaju se ostali monosaharidi, disaharidi i polifenolne komponente vezane za lanac pektina ( Minkov i sur., 1996). To rezultira gubitkom redukcijskog potencijala.

I drugi autori istraživali su mogućnosti korištenja biljnih ekstrakata bogatih polifenolima u sintezi metalnih nanočestica, a sa ciljem poboljšanja njihovih morfoloških i/ili funkcionalnih karakteristika. U radu Lateef i sur. (2016) nanočestice srebra dobivene su biogenom sintezom uz ekstrakt vrste Cola Nitida. Pritom su određena antimikrobna i antioksidativna svojstva novonastalih čestica. Pokazalo se da nanočestice sintetizirane biogenom sintezom reduciraju 49.97% feri iona ( $Fe^{3+}$ ) pri koncentraciji od 10 $\mu$ g/ml. Rezultati istraživanja Mellina i sur. (2019) također su u korelaciji sa rezultatima našeg istraživanja. Nanočestice selena

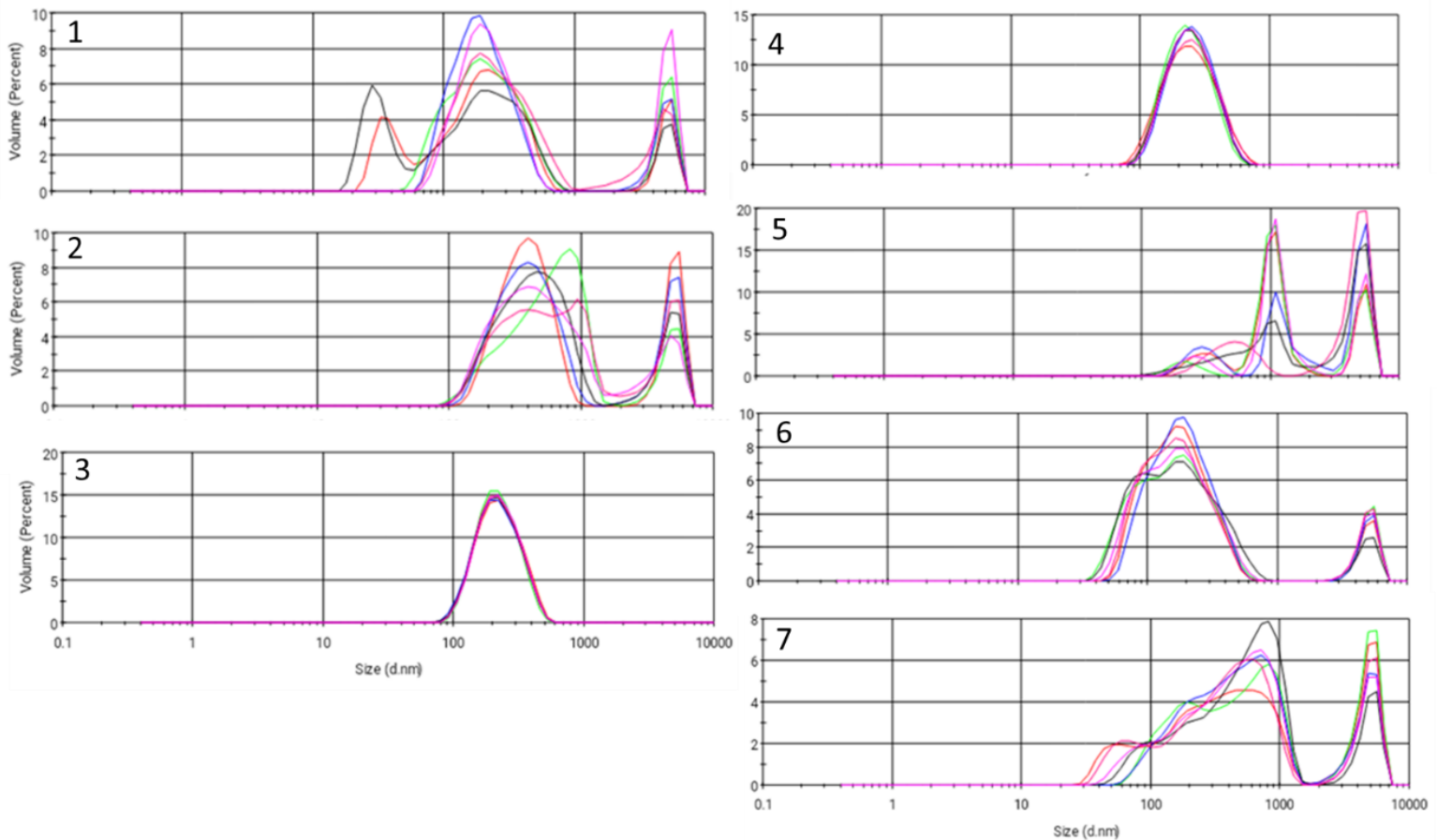
sintetizirane uz ekstrakt vrste *Theobroma cacao* pokazale su veću antioksidativnu aktivnost nego sam ekstrakt biljke.

### 4.3. Određivanje raspodjele veličine čestica



Slika 14. Prosječna veličina sintetiziranih nanočestica selena

1-uzorak sa čistim pektinom 0.35%; 2-uzorak sa čistim pektinom 0.7%; 3-uzorak sa sirovim pektinom 0.1%; 4-uzorak sa sirovim pektinom 0.3%; 5-uzorak sa sirovim pektinom 0.7%; 6-referentni uzorak; 7-uzorak sa polifenolima i čistim pektinom (0,3%).



### Slika 15. Raspodjela veličine čestica

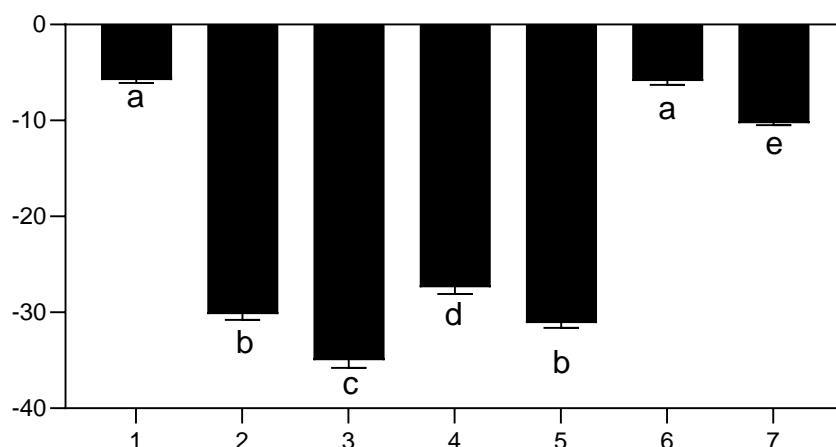
1-uzorak sa čistim pektinom 0.35%; 2-uzorak sa čistim pektinom 0.7%; 3-uzorak sa sirovim pektinom 0.1%; 4-uzorak sa sirovim pektinom 0.3%; 5-uzorak sa sirovim pektinom 0.7%; 6-referentni uzorak; 7-uzorak sa polifenolima i čistim pektinom (0,3%).

Iz podataka prikazanih na Slikama 14 i 15 vidljivo je da je način sinteze nanoSe značajno utjecao na raspodjelu veličine nastalih nanočestica. Primjenom standardne kemijske sinteze dobivene su nanočestice unimodalne raspodjele veličine čestica, prosječnog promjera 187 nm. Nanočestice dobivne biogenom sintezom bile su veće i prosječna veličina kretala se od 232 nm (uzorak 3) do čak 1150 nm (uzorak 5). Osim toga, dio biogeno sintetiziranih nanosustava vrlo je heterogen, što se vidi iz velikih standardnih devijacija (Slika 14) odnosno grafičkih prikaza raspodjela veličina nanočestica (Slika 15) što ukazuje na heterogen i potencijalno nestabilan nanosustav. Upravo stoga uzorci pripremljeni korištenjem čistog pektina i čistog pektina u kombinaciji s polifenolima (uzorci 1, 2 i 7), bez obzira na prihvatljiv prosječan promjer glavnine nanočestica nisu prihvatljive, obzirom da navedeni sustavi sadrže i značajne postotke većih i manjih nanočestica. Uzorak 5, osim što je također izrazito heterogen sadrži vrlo velike nanočestice (1150 nm) što sustav čini nestabilnim. Također, tako velike nanočestice imat će zasigurno vrlo nisku oralnu bioraspoloživost.

Nasuprot svemu navedenom, primjena sirovog pektina u koncentracijama 0.1 i 0.3% rezultirala je nastankom uniformnih nanosustava sa prosječnom veličinom nanočestica 232 nm odnosno 292 nm što ih čini optimalnim izborom za provođenje biogene sinteze nanoSe. Daljnjim povećanjem sirovog pektina u reakcijskoj smjesi sustav se destabilizira i dolazi do nastajanja velikih aglomerata(uzorak 5).

Dobiveni rezultati u skladu su rezultatima drugih autora koji su uspješno primjenjivali pektin kao inkapsulacijsko sredstvo u sintezi metalnih nanočestica. Foba-Tendo i suradnici (2012) uspješno su koristili pektin u stabilizaciji nanočestica željeznog oksida. Također, Zahran i sur. (2014) koristili su pektin kao inkapsulacijsko sredstvo u sintezi nanosrebra te dobili monodisperzne sustave vrlo sitnih nanočestica srebra prosječne veličine 5-10 nm.

#### 4.4. Određivanje zeta potencijala





*Slika 16. Zeta potencijal uzoraka*

*1-uzorak sa čistim pektinom 0.35%; 2-uzorak sa čistim pektinom 0.7%; 3-uzorak sa sirovim pektinom 0.1%; 4-uzorak sa sirovim pektinom 0.3%; 5-uzorak sa sirovim pektinom 0.7%; 6-referentni uzorak; 7-uzorak sa polifenolima i čistim pektinom (0,3%). Stupići označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )*

Slika 16 pokazuje da se zeta potencijali nanočestica nalaze u rasponu od -35.0 mV (uzorak 3) do -5.8 mV (uzorak 1). Uzorak 3 s najmanjim postotkom sirovog pektina ima najveću vrijednost negativnog zeta potencijala, odnosno predstavlja najstabilniji sustav. Dodatak sirovog pektina u većem postotku ne pridonosi većoj stabilnosti nanosustava (uzorci 4 i 5). Uzorci 2 i 5 s 0.7% čistog i 0.7% sirovog pektina imaju vrlo slične vrijednosti zeta potencijala što ukazuje da pročišćavanje pektina ne utječe značajno na zeta potencijal.

Suspenzije s većim iznosom zeta potencijala, bilo pozitivno ili negativno, stabilizirane su zbog elektronskih odbijanja, dok su suspenzije s nižim vrijednostima zeta potencijala sklone flokulaciji i agregaciji (Lu G. W, Gao P, 2010). Međutim treba uzeti u obzir da korištenje nenabijenih molekula također može doprinijeti stabilnosti nanosustava zbog stvaranja steričkih učinaka i manje sklonosti privlačenju čestica. Uzorak 1, referentni uzorak 6 i uzorak 7 imaju nešto niže negativne vrijednosti zeta potencijala, ali ipak čine relativno stabilne sustave jer su kao sustavi za oblaganje korištene nenabijene makromolekule (PVP, polifenoli, pektin) koje su smanjile agregaciju sustava. Ukoliko navedeni uzorci nebi bili relativno stabilni, došlo bi do precipitacije na dnu ili stijenkama epruvete.

U istraživanju Hsieh i sur. (2012) nanočestice zlata sintetizirane su uz dodatak epigalokatehina galata u različitim postocima. Čestice s većim postotkom dodanog epigalokatehin galata pokazale su manju vrijednost zeta potencijala, ali povećano  $t_{1/2}$  u plazmi što pokazuje da manja negativna vrijednost zeta potencijala ne mora biti odlučujući faktor u određivanju stabilnosti sustava.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primjena pročišćenog pektina iz kore mandarine kao inkapsulacijskog sredstva u sintezi nanoselena rezultira nastankom izrazito polidisperznih sustava sa prosječnim promjerom čestica od 239 odnosno 425 nm, ovisno o primijenjenoj koncentraciji pektina (0.1 i 0.3%). Nastale nanočestice pokazuju vrlo nisku antioksidativnu aktivnost (0.78 i 0.74 g GAE/mol nSe). Stoga pročišćena pektinska frakcija kore mandarine nije pogodno inkapsulacijsko sredstvo u sintezi nanoselena.
2. Primjenom sirovog pektina izoliranog iz kore mandarine u koncentracijama od 0.1% i 0.3% moguće je sintetizirati stabilne nanosustave elementarnog selena sa prosječnim veličinom čestica od 232 nm odnosno 292 nm i zeta potencijalom od -27.4mV odnosno -35mV. Daljnji porast udjela sirovog pektina (0.7%) u reakcijskoj smjesi rezultira nastajanjem velikih nestabilnih agregata većih od 1000 nm. Nastale čestice značajno su veće od onih dobivenih kemijskom sintezom (187 nm).
3. Nanočestice selena inkapsulirane sirovim pektinom izoliranim iz kore mandarine (0.1 i 0.3%) pokazuju značajno veću antioksidativnu aktivnost od kemijski sintetiziranog nanoselena (2.46 i 1.86 g GAE/mol nSe u odnosu na 0.46g GAE/mol nSe). Daljnjim povećanjem udjela sirovog pektina u reakcijskoj smjesi (0.7%) značajno se povećava antioksidacijski potencijal nanočestica (5.86g GAE/mol nSe) međutim nastaju nanočestice neprihvatljivih morfoloških karakteristika (visoko polidisperzni sustav uz nastajanje aglomerata većih od 1000 nm)
4. Dodatkom polifenolnog ekstrakta kore mandarine u reakcijsku smjesu koja sadrži 0.3% pročišćenog pektina nastaju nanočestice vrlo visokog antioksidativnog potencijala (8.55 g GAE/mol nSe) međutim nastali nanosustav je polidisperzan sa prosječnom veličinom čestica 506 nm. Dakle usprkos činjenici da se polifenoli iz ekstrakta kore mandarine adsorbiraju na površinu nastalih nanočestica selena i ostvaruju antioksidativne učinke, oni značajno povećavaju promjer nastalih nanočestica i destabiliziraju sustav te se ne mogu primjenjivati na ovaj način.
5. Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na daljnju optimizaciju protokola ekstrakcije pektina, polifenola i sinteze nanoselena kako bi se sintetizirale čestice manje od <100 nm (čime bi se osigurala bolja oralna bioraspoloživost) visokog antioksidativnog potencijala.

## 6. LITERATURA

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants. *Plant Sci*, 2012, 196, 67-74.

Ainsworth E, Gillespie K. Estimation of total phenolic and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Natur Protoc*, 2007, 2, 63-65.

Biljni pigmenti, 2013., <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti>, pristupljeno 02.07.2020.

Casas-Orozco D, Villa AL, Bustamante, F, González, LM. Process development and simulation of pectin extraction from orange peels. *Food Bioprod. Process*, 2015, 96, 86–98.

Dudaš S, Ferencić D. Hranjiva vrijednost mandarina. *Glasnik zaštite bilja*, 2016, 39, 46-51.

Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr*, 2010, 91, 1486-1491.

Funkcije selena, 2015., <http://www.definicijahrane/minerali/selen-se>, pristupljeno 15.7.2020.

Guillon F, Champ M. Structural and physical properties of dietary fibers and consequences of processing on human physiology. *Food Resear Int*, 2020, 33, 237-244.

Gullón B, Gómez B, Martínez-Sabajanes M, Yáñez R, Parajó JC, Alonso JL. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends in Food Sci & Tech*, 2013, 30, 154-157.

Hidrokoloidi i pektinske supstance u voću i povrću, 2013., <http://tehnologijahrane.hr/pektini>, pristupljeno 15.7.2020.

Hsieh Dar S, Lu H, Chen C, Wu C, Yeh M. The preparation and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles as a novel delivery system. *Int J Nanomed*, 2012, 7, 1623-1629.

Ingale A, Chaudhari AN. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco-Friendly Approach. *J Nanomed Nanotech*, 2013,4, 3-6.

Kapur M, Kohli K, Soni K. Green. Synthesis of Selenium Nanoparticles from Broccoli, Characterization, Application and Toxicity. *Adv Tech Biol Med*, 2017, 56-59.

Kim Y, Wicker L. Pectin and health. U: Encyclopedia of Food and Health. Caballero B, Finglas P, Toldra F, urednici, Academic Press, 2016, str. 289-293.

Läuchli A. Selenium in plants: Uptake, functions, and environmental toxicity. *Bot Acta*, 1993, 106, 455-468.

Li B, Smith M, Hossain M. Extraction of phenolics from citrus peels I. *Solvent extract and method Separat and Purif Tech*, 2006, 48, 182–188.

Lu G. W, Gao P. Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. U: Handbook of Noninvasive Drug Delivery Systems. Kulkarni Vithall, urednik, New York, 2010, 59-63.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesey C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer Soc for Clin Nutr*, 2004, 5, 735-746.

Mellinas C, Jiménez A, Garrigós C. Microwave-Assisted Green Synthesis and Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Using *Theobroma cacao* L. Bean Shell Extract, *Molecules*, 2019, 24, 40-48.

Miller N, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 1993, 84, 407-412.

Mulvihill E, Assini J, Lee J, Allister E, Sutherland B, Koppes J, Sawyez C, Edwards J, Telford D, Charbonneau A, St-Pierre P, Marette A, Huff M. Nobiletin Attenuates VLDL Overproduction, Dyslipidemia, and Atherosclerosis in Mice With Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabet*, 2011, 60, 1449-1455.

Mustacich, D, Powis, G. Thioredoxin reductase. *Biochem. J*, 2000, 346, 1-8.

Nishiumi S, Miyamoto S, Kawabata K, Ohnishi K, Mukai R, Murakami A, Ashida H, Terao J. Dietary flavonoids as cancer – preventive and therapeutic factors. *Frontiers in biosci*, 2011, 3, 55-62.

Qadir S, Abidi S, Azhar I, Mahmood Z. Antioxidant activity and cytotoxicity of pectin extracted from orange peels. *Pakistan Jour of Pharm*, 36, 2019, 5-24.

Raheman F, Deshmukh S, Ingle A, Gade A, Rai M. Silver nanoparticles: Novel antimicrobial agent synthesized from an endophytic fungus *Pestalotia* sp. isolated from leaves of *Syzygium cumini* (L.). *Nano Biomed Eng*, 2011, 3, 174-178.

Ro, J, Kim Y, Jang SB, Lee HJ, Chakma S, Jeong JH, Lee J. Anti-Oxidative Activity of Pectin and Its Stabilizing Effect on Retinyl Palmitate. *Korean Jour of Physio & Pharm*, 2013, 17, 197-201.

Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Gaforio J. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antiox*, 2019, 8, 15-18.

Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*, 2013, 6, 25-47.

Saito, Y, Takahashi, K. Selenoprotein P. Its Structure and Functions, *Journal of health sci*. 2000, 46, 409-413.

Sasidharan S, Balakrishnaraja R, Sowmiya R. Biosynthesis of selenium nanoparticles using citrus reticulata peel extract. *World jour of pharm research*, 2015, 4, 1322-1330.

Selen za Hashimotov tireoitidis i hipotireozu, 2015., <https://dokaziumedicini.hr/selen-za-hashimotov-tireoitidis-i-hipotireozu>, pristupljeno 13.7.2020.

Slunjski S, Čoga L. Korisni elementi u tlu: Selen. Priručnik za uzorkovanje i analitiku tla Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, 2018, str. 173-175.

Tečaj: Selen, 2020., <https://www.tecaj.plantagea.hr/proizvod/tecaj-selen/>, pristupljeno 2.8.

Tingji U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*, 2008 13, 104-108.

Vyas J, Shafkat Rana. Antioxidant activity and biogenic synthesis of selenium nanoparticles using the leaf extract of aloe vera, *Int Jour of Current Pharm Resear*, 2017, 9, 148-152.

Wang, W, M ., Jiang P, Hu L , Zhi Z , Chen J , Ding T , Ye X, Liu D. Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions. *Food Hydrocolloids*, 2016, 15-24.

Zahran, M. K, Ahmed, H. B, El-Rafie H. Facile Size-Regulated Synthesis of Silver Nanoparticles Using Pectin. *Carb Polym*, 13, 2014, 971-978.

Zeta potencijal, 2015., <http://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>, pristupljeno 14.7.

Zhang S, Zhanga J , Wangb H , Chen H. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides. *Materi Letters*, 2004, 58, 2590-2594.

## 7. SAŽETAK

U okviru ovog rada istražena je mogućnost korištenja pektina i polifenola ekstrahiranih iz kore mandarineu biogenoj sintezi nanoselena pri čemu su sirove i pročišćene pektinske frakcije kore mandarine korištene kao inkapsulacijsko sredstvo dok je polifenolni ekstrakt korišten s namjerom poboljšanja antioksidativnog potencijala nastalih nanočestica. Nastali nanosustavi karakterizirani su primjenom difrakcijske laserske spektroskopije te su na taj način određeni promjeri i zeta potencijal nastalih čestica. Antioksidativna aktivnost čestica određena je Folin-Ciocalteu metodom. Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da se primjenom sirovog pektina izoliranog iz kore mandarine u koncentracijama od 0.1% i 0.3% mogu sintetizirati stabilne nanosustavi od 232 nm odnosno 292 nm i zeta potencijalom od -27.4 odnosno -35. Također, nanočestice selena inkapsulirane sirovim pektinom izoliranim iz kore mandarine (0.1 i 0.3%) pokazuju značajno veću antioksidativnu aktivnost od kemijski sintetiziranog nanoselena (2.46 i 1.86 g GAE/mol nSe u odnosu na 0.46 g GAE/mol nSe). Polifenoli iz ekstrakta kore mandarine adsorbiraju na površinu nastalih nanočestica selena i ostvaruju antioksidativne učinke, međutim značajno povećavaju promjer nastalih nanočestica i destabiliziraju sustav te se ne mogu primjenjivati na ovaj način. Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na standardizaciju postupka ekstrakcije i karakterizaciju pektina iz kore mandarine te optimizaciju izrade polifenolnog ekstrakta, a sa ciljem dobivanja nešto manjih nanočestica, a većeg antioksidativnog potencijala.

## SUMMARY

The main goal of this thesis was to determine the possibility of using pectin and polyphenols extracted from mandarin peel in biogenic synthesis of nanoselen where raw and purified pectin fractions of mandarin peel were used as an encapsulating agent, while polyphenolic extract was used to improve the antioxidant potential of nanoparticles. Zeta potential and average diameters of formed nanoparticles were determined by laser diffraction spectroscopy. The antioxidant activity of the particles was determined by the Folin-Ciocalteu method. The results of the conducted research show that by using crude pectin isolated from mandarin peel in concentrations of 0.1% and 0.3%, stable nanosystems of 232 nm and 292 nm and zeta potential of -27.4mV and -35mV can be synthesized. Also, selenium nanoparticles encapsulated with crude pectin (0.1 and 0.3%) show significantly higher antioxidant activity than chemically synthesized nanoselen (2.46 and 1.86 g GAE / mol nSe compared to 0.46 g GAE / mol nSe). Polyphenols from mandarin peel extract adsorb on the surface of the formed selenium nanoparticles and contribute to the antioxidant effects. However, they significantly increase the diameter of the formed nanoparticles and destabilize the system.

Future research needs to focus on standardization of the pectin extraction process and its characterization as well as optimization of polyphenol extract production, with the aim of obtaining smaller nanoparticles with higher antioxidant potential.



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Biogena sintena nanočestica seleno uz ekstrakt polifenola i pektina iz kore mandarine

Marta Gosarić

#### SAŽETAK

U okviru ovog rada istražena je mogućnost korištenja pektina i polifenola ekstrahiranih iz kore mandarine u biogenoj sintezi nanoselena pri čemu su sirove i pročišćene pektinske frakcije kore mandarine korištene kao inkapsulacijsko sredstvo dok je polifenolni ekstrakt korišten s namjerom poboljšanja antioksidativnog potencijala nastalih nanočestica. Nastali nanosustavi karakterizirani su primjenom difrakcijske laserske spektroskopije te su na taj način određeni promjeri i zeta potencijal nastalih čestica. Antioksidativna aktivnost čestica određena je Folin-Ciocalteu metodom. Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da se primjenom sirovog pektina izoliranog iz kore mandarine u koncentracijama od 0.1% i 0.3% mogu sintetizirati stabilne nanosustavi od 232 nm odnosno 292 nm i zeta potencijalom od -27.4 odnosno -35. Također, nanočestice seleno inkapsulirane sirovim pektinom izoliranim iz kore mandarine (0.1 i 0.3%) pokazuju značajno veću antioksidativnu aktivnost od kemijski sintetiziranog nanoselena (2.46 i 1.86 g GAE/mol nSe u odnosu na 0.46 g GAE/mol nSe). Polifenoli iz ekstrakta kore mandarine adsorbiraju na površinu nastalih nanočestica seleno i ostvaruju antioksidativne učinke, međutim značajno povećavaju promjer nastalih nanočestica i destabiliziraju sustav te se ne mogu primjenjivati na ovaj način. Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na standardizaciju postupka ekstrakcije i karakterizaciju pektina iz kore mandarine te optimizaciju izrade polifenolnog ekstrakta, a sa ciljem dobivanja nešto manjih nanočestica, a većeg antioksidativnog potencijala.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 16 grafičkih prikaza, 5 tablica i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kora mandarine, sirovi pektin, polifenolni ekstrakt, antioksidacijsko djelovanje, raspodjela veličine čestica

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. Ivan Pepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Petra Turčić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujna, 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

### Biogenic synthesis of selen nanoparticles using polyphenols and pectin extracted from mandarine peel

Marta Gosarić

#### SUMMARY

The main goal of this thesis was to investigate the possibility of using pectin and polyphenols extracted from mandarin peel in biogenic synthesis of nanoselen where raw and purified pectin fractions of mandarin peel were used as an encapsulating agent, while polyphenolic extract was used to improve the antioxidant potential of nanoparticles. Zeta potential and average diameters of formed nanoparticles were determined by laser diffraction spectroscopy. The antioxidant activity of the particles was determined by the Folin-Ciocalteu method. The results of the conducted research show that by using crude pectin isolated from mandarin peel in concentrations of 0.1% and 0.3%, stable nanosystems of 232 nm and 292 nm and zeta potential of -27.4mV and -35mV can be synthesized. Also, selenium nanoparticles encapsulated with crude pectin (0.1 and 0.3%) show significantly higher antioxidant activity than chemically synthesized nanoselen (2.46 and 1.86 g GAE / mol nSe compared to 0.46 g GAE / mol nSe). Polyphenols from mandarin peel extract adsorb on the surface of the formed selenium nanoparticles and contribute to the antioxidant effects. However, they significantly increase the diameter of the formed nanoparticles and destabilize the system.

Future research needs to focus on standardization of the pectin extraction process and its characterization as well as optimization of polyphenol extract production, with the aim of obtaining smaller nanoparticles with higher antioxidant potential.

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

Thesis includes: 36 pages, 16 figures, 5 tables and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Mandarine peel, crude pectin, polyphenol extract, antioxidative activity, size distribution

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  
**Ivan Pepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Petra Turčić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2020.