

Primjena funkcionalnih ekstrakta iz prehrambenog otpada u sintezi nanočestica selena - utjecaj na stabilnost tijekom probave

Vitlov, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:802388>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



Karla Vitlov

**Primjena funkcionalnih ekstrakta iz
prehrambenog otpada u sintezi nanočestica
selena – utjecaj na stabilnost tijekom probave**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom 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 prof.dr.sc. Dubravki Vitali Čepo na savjetima, potpori i stručnom vodstvu u izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistentici Kristini Radić na pomoći kod eksperimentalnog dijela rada. Ovim putem se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene kroz cjelokupno obrazovanje.

Sadržaj

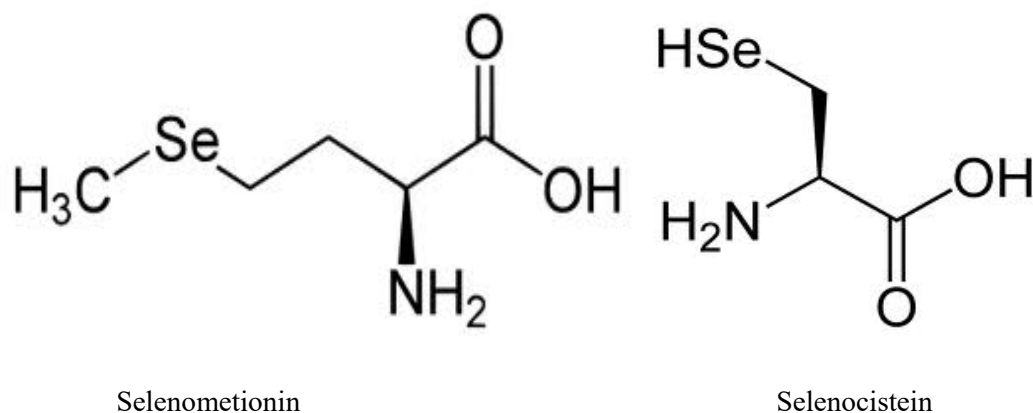
<u>1. UVOD</u>	1
<u>1.1. SELEN</u>	1
<u>1.1.1. Uloga selena u ljudskom organizmu</u>	2
<u>1.2. NANOSELEN</u>	3
<u>1.2.1. Sinteza nanoselena</u>	5
<u>1.2.2. Apsorpcija nanoselena u tankom crijevu</u>	6
<u>1.3. PEKTIN</u>	8
<u>1.4. KOMINA MASLINE</u>	9
<u>2. OBRAZLOŽENJE TEME</u>	11
<u>3. MATERIJALI I METODE</u>	12
<u>3.1. Kemikalije i pribor</u>	12
<u>3.2. Instrumenti</u>	13
<u>3.3. Plan eksperimentalnog rada</u>	13
<u>3.4. Sinteza uzoraka nanoselena</u>	13
<u>3.4.1. Priprema reagensa</u>	14
<u>3.4.2. Postupak biogene i kemijske sinteze nanoselena</u>	14
<u>3.5. Čišćenje uzoraka dijalizom</u>	17
<u>3.5.1. Postupak dijalize</u>	17
<u>3.6. Simulacija gastrointestinalne (GI) digestije</u>	19
<u>3.6.1. Priprema reagensa</u>	20
<u>3.6.2. Postupak provođenja gastrične faze digestije</u>	21
<u>3.6.3. Postupak provođenja intestinalne faze digestije</u>	21
<u>3.7. UV-Vis spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nanoselena</u>	21

3.7.1. Postupak izrade baždarnih dijagrama na 340 nm i 405 nm	23
3.7.2. Postupak provođenja UV-Vis spektrofotometrijskog mjerenja.....	25
3.8. Statistička analiza	25
<u>4. REZULTATI I RASPRAVA</u>	26
4.1. Optimizacija UV-Vis spektrofotometrije	26
4.2. Gastrointestinalna stabilnost čestica nanoselena	26
4.3. Biodostupnost nanočestica selena	32
<u>5. ZAKLJUČCI</u>	34
<u>6. LITERATURA</u>	35
<u>7. SAŽETAK</u>	38
<u>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</u>	

1. UVOD

1.1. SELEN

Selen je kemijski element kojeg je prvi izolirao švedski znanstvenik Jacob Berzelius Jöns 1817. godine. U prirodi se nalazi u izrazito niskim koncentracijama, stoga se ubraja u elemente u tragovima. Selen je polumetal što znači da su njegova fizikalno-kemijskim svojstva između svojstava metala i nemetala. Pri sobnoj temperaturi je stabilan i nije podložan oksidaciji. U prirodi i živim organizmima nalazi se u anorganskom i organskom obliku. Anorganski oblici selena su selenit (SeO_3^{2-}), selenid (Se^{2-}), selenat (SeO_4^{2-}) i elementarni selen (Se^0) dok su organski oblici selena selenometionin i selenocistein. Najvažniji izvori selena za opću populaciju su hrana, voda i zrak. Koncentracija selena u zraku povećava se gorenjem fosilnih goriva i ugljena dok su vulkanski plinovi glavni prirodni izvori. Pojava selena u vodi rezultat je taloženja iz atmosfere i tla. Namirnice životinjskog podrijetla koje sadrže najveću koncentraciju selena su riba, jetra, bubrezi i jaja dok su pšenica, zob, grašak, soja i brazilski oraščić glavni izvori selena biljnog podrijetla. Dominantni oblik selena u namirnicama biljnog podrijetla je selenometionin koji pokazuje visok stupanj apsorcije za razliku od ostalih organskih oblika selena prisutnih u namirnicama životinjskog podrijetla (Mehdi i sur., 2013; Barceloux, 1999).



Slika 1: Prikaz kemijske strukture selenometionina i selenocisteina (Mehdi i sur., 2013)

1.1.1. Uloga selena u ljudskom organizmu

Selen je esencijalni element u tragovima koji u ljudskom organizmu ima važnu ulogu u održavanju niza fizioloških funkcija. Raspon koncentracija u serumu potreban za održavanje fizioloških funkcija kreće se od 0,10 µg/kg do 0,30 µg/kg. Međutim, selen je element uske terapijske širine i povećanjem koncentracije u serumu iznad 2,00 µg/kg uzrokuje simptome toksičnosti. Simptomi akutne intoksikacije manifestiraju se kao ukočenost mišića, respiratorna depresija i intenzivna hipotenzija koje na kraju vode do fatalnih ishoda. Simptomi kronične intoksikacije selenom karakteristično se manifestiraju na koži, kosi i noktima. Na koži udova javljaju se lezije karakterizirane crvenom diskoloracijom i eritemom pa je takva oštećena koža podložna sekundarnim infekcijama. Kosa postaje rijetka i podložna pucanju, dok na tjemenu nastaje intenzivan pruritis. Nokti postaju lomljivi, a na ploči nokta nastaju žuto-bijele ili crvene pruge. Ostale manifestacije kronične intoksikacije uključuju metalan okus u ustima i miris daha po češnjaku, umor, mučninu i povraćanje (Tang i sur., 2020; Barceloux, 1999).

Selen je kao esencijalan element ključan za funkcioniranje i ekspresiju najmanje 30 selenoproteina. Selenoproteini su skupina proteina koji u aktivnom mjestu sadrže selenocistein i u organizmu imaju funkciju enzima. Takvi enzimi nazivaju se selenoenzimi, dok se selenocistein zbog uloge reducensa u aktivnom mjestu istih naziva dvadeset i prvom aminokiselinom. Najvažnije skupine selenoenzima su glutation peroksidaze, jodotironin dejodinaze i tioredoksin reduktaze koje imaju ulogu u održavanju imunosne, endokrine, reproduktivne i transkripcijske homeostaze organizma (Beckett i Arthur, 2005; Rayman, 2000).

Održavanje optimalne koncentracije selena od iznimne je važnosti jer deficijencija može dovesti do razvoja različitih bolesti i općeg slabljenja funkcije organizma. Preporučeni dnevni unos za žene iznosi 55 µg, a za muškarce 70 µg. Keshan bolest i Kashin-Beck bolest dvije su endemske bolesti koje se pojavljuju u Kini zbog deficijencije selena u svakodnevnoj prehrani stanovništva toga područja. Keshan bolest manifestira se kao kardiomiopatija koja najčešće pogađa djecu i žene u reproduktivnoj dobi, dok se Kashin-Beck bolest manifestira kao kronični degenerativni osteoartritis. U organima imunosnog sustava selen se nalazi u visokim koncentracijama i aktivacijom B i T limfocita te NK-stanica iskazuje svoje imunostimulatorne učinke. U studijama provedenima na pacijentima oboljelima od raka, HIV virusa i virusa hepatitisa B i C suplementacija selenom u adekvatnim količinama smanjila je smrtnost i usporila propadanje

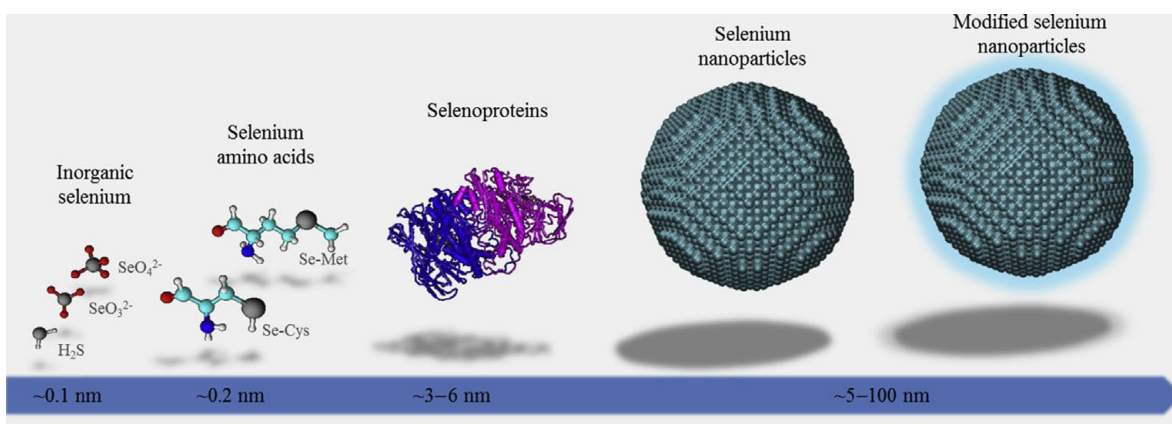
jetrenih stanica. Antioksidativni i protuupalni efekti rezultat su aktivacije enzima glutacione peroksidaze. Glutacione peroksidaze reducira vodikov peroksid i njegove derivate te time sprječava nastanak reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala. Isti enzim interferira s mehanizmom nastanka proupalnih prostaglandina i leukotriena i smanjuje upalni odgovor organizma. Suplementacija selenom pokazala je brojne pozitivne efekte kod bolesti poput reumatoidnog artritisa, pankreatitisa, astme i niza kardiovaskularnih oboljenja u čijoj su pozadini oksidativni stres i upala. Glutacione peroksidaze ključna je i za održavanje optimalne reproduktivne funkcije u oba spola. Funkcija štitne žlijezde pod utjecajem je selenoenzima dejodinaze te deficijencija selena i joda negativno utječu na metabolizam tiroidnih hormona. Brojna istraživanja potvrdila su kako niske koncentracije selena u plazmi stimuliraju progresiju bolesti središnjeg živčanog sustava poput anksioznosti, depresije, demencije i Alzheimerove bolesti (Rayman, 2000).

1.2. NANOSELEN

Prefiks „nano“ potječe od grčke riječi „nanos“ koja u prijevodu znači „patuljast“. „Nano“ u metričkom sustavu označava red veličine 10^{-9} m, dok su nanočestice čestice veličine raspona između 1 nm i 100 nm. Razvoj nanočestica pokazao je izniman potencijal u području biomedicine, dijagnostike i farmacije. Posljednjih desetljeća intenzivno se istražuju metode sinteze i učinci nanofarmaceutika u svrhu unaprjeđenja ciljane dostave lijekova i dodataka prehrani koji se apliciraju *per os*. Nanofarmaceutici pokazali su brojne prednosti nad tradicionalnim oblicima poput maskiranja neugodnih okusa i mirisa, povećavanja topljivosti i biodostupnosti, zaštite od oksidativnog stresa, enzimske degradacije i mnoge druge. Međutim, brza razgradnja, niska permeabilnost i nestabilnost u gastrointestinalnim uvjetima samo su neki od nedostataka koji ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima i razvojem nanofarmaceutika (Bayda i sur., 2019; Fardsadegh i Jafarizadeh, 2019; Hosnedlova i sur., 2018).

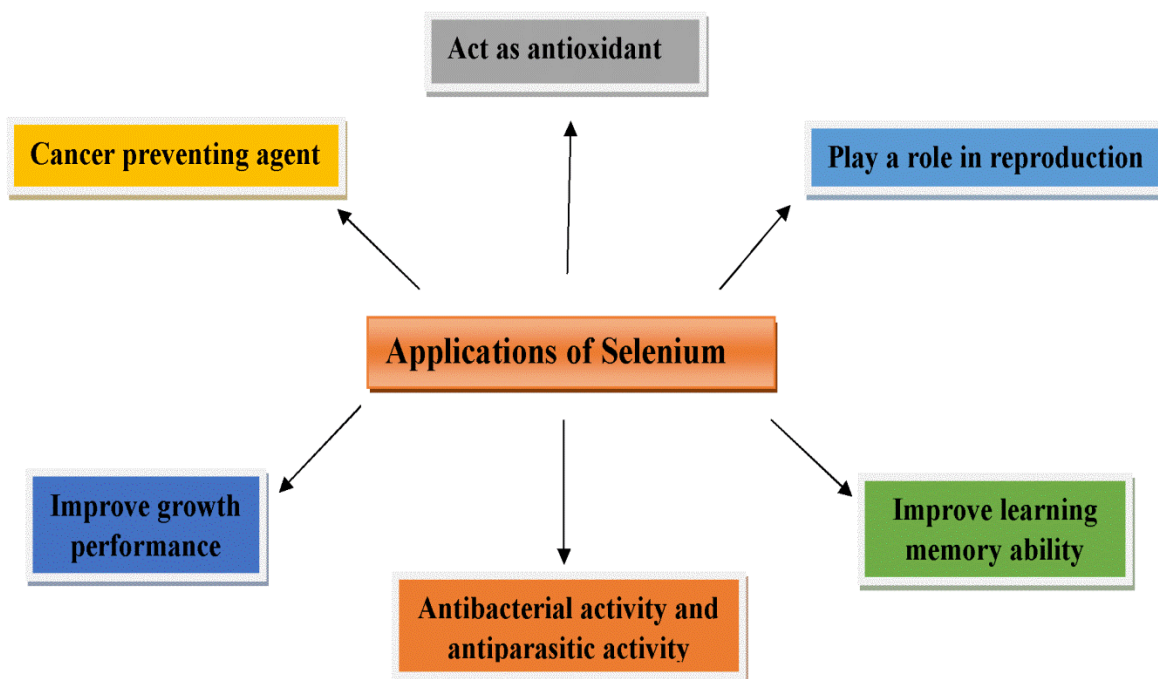
U istraživanjima dokazano je kako selen u obliku nanoforme ima znatno veću bioraspoloživost i nižu toksičnost od tradicionalnih organskih i anorganskih oblika (Hosnedlova i sur., 2018). Aktivnost čestica nanoselena ovisi o njihovoj veličini stoga manje čestice imaju veću aktivnost. Istraživanjem nanočestica veličine 0,1 μm potvrđeno je kako je njihova *in vitro* apsorpcija 2,5 – 6 puta veća od apsorpcije čestica raspona veličine od 1 μm do 10 μm . Jedna od najvažnijih prednosti nano oblika je aplikacija selena u elementarnom oksidacijskom stanju (Se^0). U usporedbi sa

selenom u višim oksidacijskim stanjima (Se^{+4} , Se^{+6}), Se^0 je znatno niže toksičnosti i povoljnije biodostupnosti, međutim takav oblik je nestabilan i podložan prelasku u inaktivnu formu. Stabilnost nanočestica s inkorporiranim elementarnim selenom može se modificirati upotrebom različitih inkapsulacijskih sredstava i nanovezikula. Prikladna veličina i morfologija čestica te vrsta inkapsulacijskog sredstva najvažniji su faktori za sintezu nanočestica selena optimalne biodostupnosti i stabilnosti. Raspon veličina različitih oblika selena prikazan je na *Slici 2* (Hosnedlova i sur., 2018; Cui i sur., 2018).



Slika 2: Prikaz raspona veličina različitih oblika selena (Skalickova i sur., 2007)

Terapijska primjena nanoselena jednaka je terapijskoj primjeni tradicionalnih oblika selena kao dodatka prehrani i prikazana je na *Slici 3*.



Slika 3: Shematski prikaz terapijske primjene nanoselena (Murugesan i sur., 2019)

1.2.1. Sinteza nanoselena

Odabir prikladne metode sinteze nanoselena zahtijeva kontrolu faktora koji mogu utjecati na svojstva krajnjeg produkta poput veličine, oblika, površine i sastava. Ključni faktori za sintezu nanočestica optimalnih svojstava su koncentracija prekursora, pH, radna temperatura i vrijeme (Skalickova i sur., 2007).

- **Fizikalna sinteza:**

Najrjeđe korištena metoda sinteze nanoselena koja uključuje procese hidrotermalne sinteze, radijacije mikrovalovima i laserske ablacije (Hosnedlova i sur., 2018).

- **Kemijska sinteza:**

U kemijskoj metodi sinteze kao prekursor upotrebljava se anorganski oblik selena poput natrijevog selenita uz askorbinsku kiselinu koja ima ulogu reducensa. U reakcijsku smjesu dodaju se u polisaharidi koji u svojoj strukturi sadrže reaktivne amino, hidroksilne i

karboksilne skupine koje imaju ključnu ulogu u formiranju i stabilizaciji nastalih nanočestica selena (Hosnedlova i sur., 2018).

- **Biogena sinteza:**

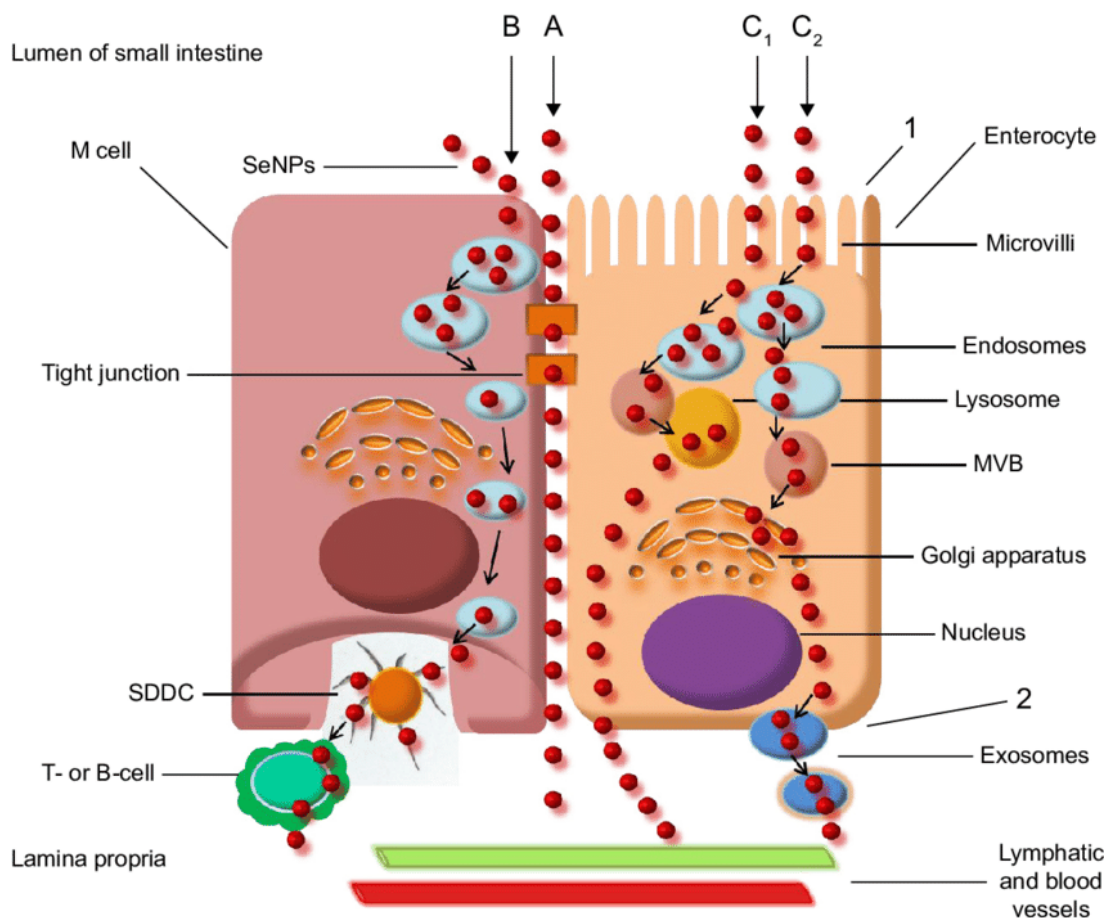
Najnovija i najčešće korištena metoda sinteze zbog svoje isplativosti, dostupnosti materijala i niske toksičnosti. Posebnost ovakve metode sinteze je upotreba sekundarnih metabolita mikroorganizama i biljaka. Sekundarni metaboliti reduciraju anorganske oblike selena i stabiliziraju nanočestice. Najčešći mikroorganizmi su *Agrobacterium* sp., *Streptomyces griseoruber*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus terreus* i *Klebsiella pneumoniae*, dok su *Aloe vera*, *Withania somnifera*, *Diospyros Montana* i *Trigonella foenum-graecum* biljne vrste korištene u biogenoj sintezi (Murugesan i sur., 2019; Skalickova i sur., 2007).

1.2.2. Apsorpcija nanoselena u tankom crijevu

Apsorpcija čestica nanoselena odvija se uglavnom kroz epitel tankog crijeva koji je po svojoj prirodi lipofilan i prekriven mikrovilima koji povećavaju apsorptivnu površinu. Stupanj apsorpcije nanoselena ovisi o svojstvima same nanočestice poput veličine, površinskog naboja i hidrofilnosti. Dokazano je kako se manje i lipofilnije nanočestice efikasnije apsorbiraju kroz epitel tankog crijeva od većih i hidrofilnijih (Hosnedlova i sur., 2018). Epitel tankog crijeva građen je od nekoliko vrsta visoko specijaliziranih stanica među kojima su najvažnije enterociti, goblet stanice i M stanice. Osnovna uloga enterocita je apsorpcija makromolekula koje dolaze u doticaj s njihovom membranom. Goblet stanice izlučuju mukus koji prekriva cijelu površinu tankog crijeva. Mukus je po svojem kemijskom sastavu uglavnom glikoprotein mucin čije su funkcije zaštita od ulaska patogena i štetnih kemikalija te održavanje optimalne pH vrijednosti. M stanice uz apsorptivnu ulogu imaju i ulogu prezentacije antigena imunskim stanicama i pokretanja imunskog odgovora (Ensign i sur., 2011).

Čestice nanoselena apsorbiraju se kroz epitel tankog crijeva na dva načina, a to su paracelularni i transcelularni transport. Paracelularni transport nanoselena odvija se kroz međustanične čvrste spojeve (eng. *tight junctions*). Učinkovitost takvog transporta ograničena je promjerom međustaničnih prostora koji se kreće između 0,3 nm i 1 nm. Transcelularni transport nanoselena

odvija se kroz specijalizirane stanice epitela tankog crijeva i započinje endocitozom. Endocitoza je vrsta aktivnog procesa koji zahtijeva utrošak energije. Čestice nanoselena internaliziraju se na apikalnoj strani intestinalne membrane, prenose se kroz stanice epitela tankog crijeva i na kraju otpuštaju na bazolateralnoj strani intestinalne membrane. Specijalizirane stanice koje sudjeluju u transcelularnom transportu su M stanice i enterociti. M stanice nakon endocitoze tvore niz vezikula s nanočesticama koje na kraju procesa prolaska kroz epitel dolaze do dendritičkih stanica odnosno T i B limfocita. Enterociti prenose nanočestice selena kroz epitel tankog crijeva na dva načina. Prvi način započinje endocitozom i nastavlja stvaranjem endosoma i mikrovezikula. Mikrovezikule se zatim spajaju s lizosomima i transportiraju kroz enterocit do lamine proprie. Drugi način transcelularnog transporta posredovanog enterocitima istovjetan je prvom osim što se stvorene mikrovezikule ne spajaju s lizosomima nego s Golgijevim aparatom i kao takve se prenose do lamine proprie. Lamina propria sadrži velik broj krvnih i limfnih žila pa se nanočestice nakon apsorpcije prenose u krvotok i limfni sustav (Hosnedlova i sur., 2018; Ensign i sur., 2011). Mehanizam transporta nanoselena kroz epitel tankog crijeva prikazan je na *Slici 4*.



Slika 4: Prikaz transporta nanoselena kroz intestinalnu mukožu tankog crijeva.

1 – apikalna membrana enterocita; 2 – bazolateralna membrana enterocita; A – paracelularni transport; B – transcelularni transport kroz M stanice; C1 – prvi mehanizam transcitoze kroz enterocite; C2 – drugi mehanizam transcitoze kroz enterocite (Hosnedlova i sur., 2018)

1.3. PEKTIN

Pektin je po svom kemijskom sastavu skupina polisaharida koji se nalaze u staničnoj stijenci biljaka. Iako je pektin strukturno iznimno kompleksan sustav, galakturonska kiselina čini čak 70% njegovog ukupnog sastava. Gotovo svi polisaharidi sadržavaju galakturonsku kiselinu povezanu α -(1→4) glikozidnim vezama u polisaharidni lanac. U manjem udjelu u ukupnoj strukturi pektina nalazimo homogalakturonan, ramnogalakturonan, supstituirane galakturonane i ksilogalakturonan. Pektin u biljkama ima važnu funkcionalnu ulogu u rastu, morfogenezi, obrani, signalizaciji te aktivaciji faktora rasta i enzima. U prehrambenoj i kozmetičkoj industriji koristi se kao sredstvo za geliranje i stabilizaciju. Dokazani su i pozitivni učinci pektina na ljudsko zdravlje

poput smanjenja razine kolesterola i glukoze, stimulacije imunskog odgovora i protutumorskih učinaka. Komina jabuke i kora citrusa glavni su biljni materijali iz kojih se izolira pektin za široku primjenu (Thakur i sur., 2009; Mohnen, 2008).

Biopolimeri, poput pektina, se zbog svojih iznimno povoljnih svojstava poput netoksičnosti, biokompatibilnosti, stabilnosti i niske cijene intenzivno istražuju u području biomedicine i farmacije. Pektin se kao nosač lijekova i u nano-formulaciji koristi za ciljanu dostavu lijeka na mjesto djelovanja te posljedično smanjuje inicijalnu dozu i toksičnost istog. Od posebne je važnosti u razvoju novih oblika lijekova za liječenje bolesti probavnog sustava zbog stabilnosti pri uvjetima niskog pH i otpornosti na djelovanje intestinalne mikroflore. Iznimno je koristan u terapiji metaboličkih bolesti poput pretilosti i dijabetesa jer povećava motilitet i peristaltiku gastrointestinalnog sustava te usporava apsorpciju hrane. Probioticima, kao široko upotrebljavanim dodacima prehrani, kroz integraciju s pektinom povećava se učinkovitost i biodostupnost dok sam pektin može djelovati kao prebiotik (Zaitseva i sur., 2020; Wójcik-Pastuszka i sur., 2020).

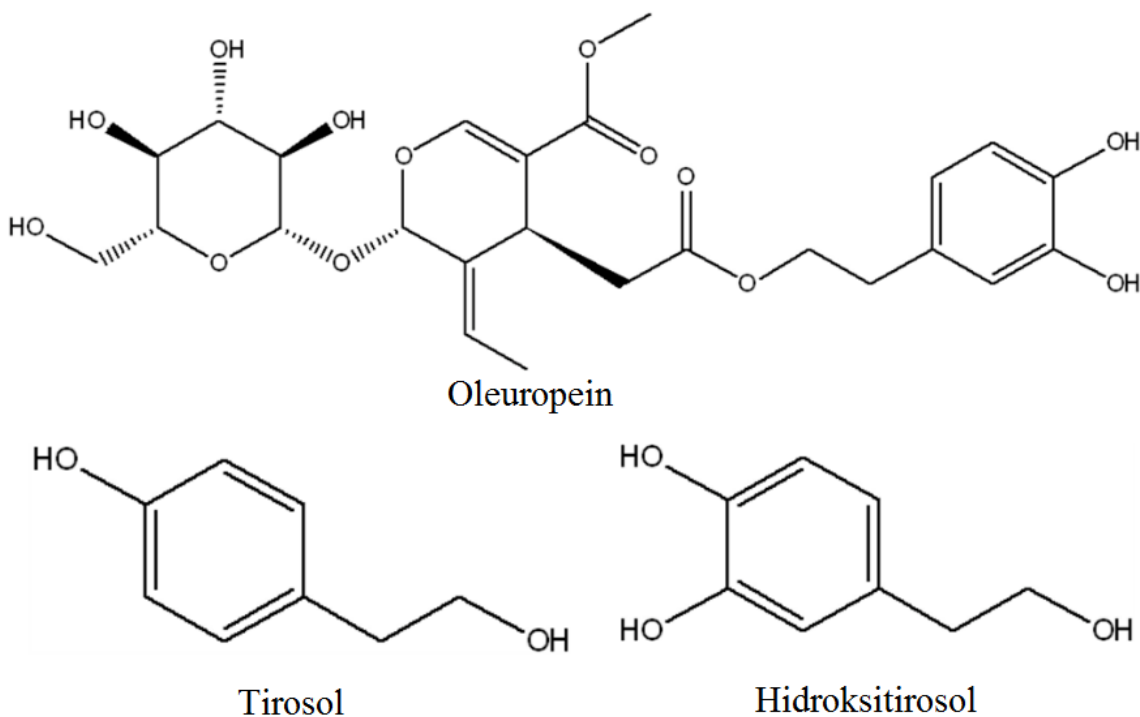
1.4. KOMINA MASLINE

Proizvodnja maslinovog ulja važna je poljoprivredna grana ponajviše u mediteranskim zemljama. Količina otpada koja zaostaje nakon proizvodnje iznosi i do 10 milijuna tona godišnje. Takav otpad zbog svojih izrazito fitotoksičnih svojstava mora biti procesuiran i odlagan na poseban način, stoga predstavlja veliki ekološki i ekonomski problem. Mali dio ponovo se koristi kao gnojivo, biognojivo i aditiv u stočnoj hrani, dok ostatak ostaje potpuno neiskorišten. Kako bi se smanjio negativan utjecaj na okoliš i povećala isplativost proizvodnje maslinovog ulja sve se više pažnje posvećuje otpadnim produktima kao potencijalnim izvorima energije i bioaktivnih molekula.

Komina masline predstavlja čvrsti proizvodni ostatak koji se sastoji od samljevene koštice, pulpe i kožice ploda masline. Po svom kemijskom sastavu komina masline je heterogena smjesa metala, šećera i polifenola te sadrži male količine zaostalog ulja i vode. Polifenoli, kao biološki aktivni spojevi, od posebnog su interesa za ponovnu uporabu otpada nastalog proizvodnjom maslinovog ulja. Tijekom proizvodnje, 2% ukupnih polifenola ekstrahira se u maslinovo ulje, dok preostali dio nalazimo u komini masline što je čini sjajnim izvorom istih (Čepo i sur., 2018). Ekstrakcija otapalom je najčešći način izolacije polifenola iz komine masline. Ekstrakcija se provodi

primjenom različitih otapala, nakon koje se otapala naknadno uparuju na rotavaporu. Etanol se pokazao kao izvrsno ekstrakcijsko sredstvo zbog svoje cijene, netoksičnosti i mogućnosti ponovne uporabe. Dobiveni ekstrakt komine masline koristi se u daljnjim istraživanjima bioloških učinaka izoliranih polifenola.

Ekstrakt komine masline kao najzastupljenije polifenolne komponente sadrži oleuropein, tirosol i hidroksitirosol čije su kemijske strukture prikazane na *Slici 5*. Sve navedene komponente pokazuju snažno antioksidativno djelovanje, među kojima je najpotentniji hidroksitirosol. Uz antioksidativno dokazano je i protuupalno, kardioprotektivno, hipoglikemijsko i antikancerogeno djelovanje. Raznim fiziološkim procesima oslobađaju se slobodni radikali te induciraju oksidativni stres koji za posljedicu ima nastanak i progresiju patoloških procesa poput upale, starenja, raka, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa. Polifenoli svojim antioksidativnim svojstvima pomažu redukciji slobodnih radikala, aktivaciji protuupalnih signalnih puteva i jačanju obrambenih mehanizama stanice (Difonzo i sur., 2021; Čepo i sur., 2018; De Bruno i sur., 2018).



*Slika 5: Kemijska struktura oleuropeina, tirosola i hidroksitirosola
(Chin i Ima-Nirwana, 2016)*

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Selen je esencijalni element u ljudskom organizmu jer su selenoenzimi ključni su za postizanje optimalne imunosne, endokrine, reproduktivne i kognitivne funkcije organizma. Zbog niskog unosa selena u svakodnevnoj prehrani deficijencija tog mikroelementa postaje sve veći zdravstveni problem, stoga se u ljekarničkoj praksi sve češće preporučuje suplementacija istim. Selen je u tradicionalnim dodacima prehrani prisutan u organskim i anorganskim oblicima koji su varijabilne biodostupnosti i učinkovitosti. Razvojem novih tehnologija omogućena je sinteza nanočestica s elementarnim selenom. Elementarni selen, za razliku od tradicionalnih oblika selena, pokazuje znatno bolje učinke, no iznimno je nestabilan. Kako bi se omogućila učinkovita dostava nanočestica s inkorporiranim elementarnim selenom na mjesto djelovanja nužno je sintetizirati stabilne oblike optimalnih svojstava, veličine i morfologije. Dokazano je kako različita inkapsulacijska sredstva korištena u sintezi nanoselena utječu na biokemijske značajke krajnjeg produkta.

Cilj ovog eksperimentalnog rada je istražiti utjecaj biogenih inkapsulacijskih sredstava ekstrahiranih iz otpada hrane (komine rajčice i mandarine te ekstrakt komine masline) na stabilnost sintetiziranih nanočestica selena u uvjetima gastrointestinalnog trakta te usporediti njihova svojstva s nanočesticama pripremljenima korištenjem sintetskih inkapsulacijskih sredstava (polisorbat i polivinilpirolidon).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i pribor

- Polivinilpirolidon (Sigma Aldrich, SAD)
- Polisorbat -Tween 20 (Sigma Aldrich, SAD)
- L-askorbinska kiselina (Kemika, Hrvatska)
- Na_2SeO_3 (Sigma Aldrich, SAD)
- Ekstrakt komine masline
- Ultračista voda (miliQ H_2O)
- NaOH (Sigma Aldrich, SAD)
- HCl (1 mol L^{-1} , 6 mol L^{-1}) (Kemika, Hrvatska)
- CaCl_2 (Sigma Aldrich, SAD)
- Pepsin ($\geq 500 \text{ U mg}^{-1}$) (pepsin izoliran iz gastične mukoze svinje; Sigma Aldrich, SAD)
- Pankreatin (aktivnost ekvivalentna 4x U.S.P. specifikaciji) (pankreatin izoliran iz gušterače svinje; Sigma Aldrich, SAD)
- Žučne soli (Sigma Aldrich, SAD)
- Odmjerne tikvice
- Tikvice s okruglim dnom
- Erlenmeyerove tikvice širokog grla
- Čaše
- Falcon kivete
- Trbušaste pipete
- Graduirane pipete
- Automatske mikropipete
- Multikanalna pipeta
- Mikrotitarska ploča
- HPLC filter

3.2. Instrumenti

- Analitička vaga, AB265-S (Metler Toledo, Indija)
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L (Mixer UZUSIO, Japan)
- Magnetska miješalica, MIX 15 eco (2mag AG, Njemačka)
- Dijalizijska membrana, D9527-100FT, MWCO 14 000 Da (Sigma Aldrich, SAD)
- Rotavapor (Buchi, Švicarska)
- pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Metrohm, Švicarska)
- Termostatirana kupelj s mućalicom, tip 1086 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka)
- UV-Vis spektrometar UV 4-100 (ATI Unicam, Cambridge, Velika Britanija)

3.3. Plan eksperimentalnog rada

- Biogena i kemijska sinteza uzoraka nanoselena
- Čišćenje uzoraka nanoselena dijalizom
- Uparavanje uzoraka nanoselena na rotavaporu
- Simulacija probave – standardizirana *in vitro* metoda
- Spektrofotometrijsko određivanje količine nanoselena

3.4. Sinteza uzoraka nanoselena

Osnovni princip sinteze čestica nanoselena temelji se na reakciji redukcije natrijevog selenita (Na_2SeO_3) u elementarni selen uz L-askorbinsku kiselinu kao reducens. Prilikom nastanka elementarnog selena boja otopine mijenja se iz bistre i prozirne u bistru i crvenu. Elementarni selen je karakteristične crvene boje te nam takva promjena ukazuje na nastanak istog.

Biogena sinteza odvija se uz L-askorbinsku kiselinu koja ima ulogu reducensa, a kao inkapsulacijska sredstva korišteni su PVP, PS (sintetska) sirovi pektin rajčice, pročišćeni pektin rajčice, sirovi pektin mandarine i pročišćeni pektin mandarine (biogena). EKM ima ulogu prirodnog izvora reducensa i/ili inkapsulacijskog sredstva te je u postupcima sinteze kombiniran sa sintetskim inkapsulacijskim sredstvima.

3.4.1. Priprema reagensa

- PVP (1%): izvagati 1,000 g PVP-a i otopiti u 100 mL miliQ vode
- PS (Tween 20): izvagati 110 mg PS i dodati miliQ vode do 1100 mg (razrjeđenje 10 puta)
- L-askorbinska kiselina (0,1 M): izvagati 1,762 g L-askorbinske kiseline i otopiti u 100 mL miliQ vode. Otopina L-askorbinske kiseline priprema se neposredno prije postupka sinteze zbog nestabilnosti iste.
- Na₂SeO₃ (0,1 M): izvagati 172,9 mg Na₂SeO₃ i otopiti u 10 mL miliQ vode.
- EKM (1%): izvagati 300 mg EKM i otopiti u 30 mL miliQ vode. Otopinu EKM potrebno je neposredno prije sinteze profiltrirati kroz HPLC filter (veličina pora 0,4 μm).

3.4.2. Postupak biogene i kemijske sinteze nanoselena

Postupak biogene i kemijske sinteze nanoselena započinje postupnim miješanjem reaktanata u točno određenim volumenima kako je prikazano u *Tablici 1*. U reakcijsku posudu doda se miliQ voda i inkapsulacijsko sredstvo (PVP, PS, pektini). Reakcijska smjesa se zatim postavi na magnetsku miješalicu, ubaci se magnetski mješač te se brzina miješanja podesi na 3. Smjesa se miješa 15 minuta kako bi se inkapsulacijsko sredstvo postupno dispergiralo u miliQ vodi. Potom se u reakcijsku smjesu doda L-askorbinska kiselina i EKM potom se postupno dodaje, kap po kap, otopina Na₂SeO₃ brzinom 1 kap/2 sekunde. Dodatkom Na₂SeO₃ otopina mijenja boju iz bistre, prozirne u crvenu kako je prikazano na *Slici 6*. Smjesa ostaje na magnetskoj miješalici narednih 20 minuta uz istu brzinu miješanja.

Tablica 1: Izrada reakcijskih smjesa

Kratika uzorka	L-ask (0.1M) mL	L-ask (1M) mL	PVP (1%) mL	PS (10%) mL	PRr mL	PRp mL	PMr mL	PMp mL	EKM (1 %) mL	Na ₂ SeO ₃ (0.1M) mL	voda mL	total mL
nSePS	1,7			0,08						0,35	27,87	30
bnSePVP	3,3		3						5	0,33	18,37	30
bnSePS	1,7			0,08					5	0,35	22,87	30
PRr		1			7,5					1	19,5	29
PMr		1					7,5			1	19,5	29
PRp		0,5				2,9				0,5	10,6	14,5
PMp		0,5						2,9		0,5	10,6	14,5
nSePVP		0,5	1,45							0,5	12,05	14,5

nSePS – sintetski nanoselen inkapsuliran polisorbitom; *bnSePVP* – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polivinilpirolidonom; *bnSePS* – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polisorbitom; *PRr* – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom rajčice; *PMr* – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom mandarine; *PRp* – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom rajčice; *PMp* – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom mandarine; *nSePVP* – sintetski nanoselen inkapsuliran polivinilpirolidonom; *L-ask* – *L* askorbinska kiselina; *PVP* – polivinilpirolidon; *PS* – polisorbit; *PRr* – sirovi pektin rajčice; *PRp* – pročišćeni pektin rajčice; *PMr* – sirovi pektin mandarine; *PMp* – pročišćeni pektin mandarine; *EKM* – ekstrakt komine masline



Slika 6: Prikaz sinteze nanoselena (Fotografija: Karla Vitlov)

Oznake uzoraka, inkapsulacijska sredstva te njihove koncentracije upotrebljene za sintezu navedeni su u *Tablici 2*.

Tablica 2: Prikaz inkapsulacijskih sredstava, postotaka upotrebljenih u sintezi i vrsta nastalih nanočestica

OZNAKA UZORKA	INKAPSULACIJSKO SREDSTVO	% INKAPSULACIJSKOG SREDSTVA	VRSTA NANOČESTICA
nSePS	PS	0,03	sintetske
bnSePS	PS+EKM	0,03 + 0,17	biogene
nSePVP	PVP	0,1	sintetske
bnSePVP	PVP+EKM	0,1 + 0,17	biogene
PRr	PRr	0,20	biogene
PRp	PRp	0,05	biogene
PMr	PMr	0,20	biogene
PMp	PMp	0,05	biogene

3.5. Čišćenje uzoraka dijalizom

Sintetizirane čestice nanoselena nalaze se u reakcijskoj smjesi s reagensima upotrebljenima za sintezu. Kako bi se čestice nanoselena mogle podvrgnuti daljnjim ispitivanjima potrebno ih je pročistiti i izolirati od ostatka smjese postupkom dijalize kroz dijalizijske membrane. U postupku dijalize korištene su dijalizijske membrane od MWC 14 000 Da. Time je osigurano da se u postupku dijalize u membranama zadrže sve čestice veće od 14 000 kDa (Cui i sur., 2018).

3.5.1. Postupak dijalize

Prije provođenja postupka dijalize potrebno je pripremiti dijalizijske membrane. Dijalizijske membrane odrežu se na duljinu od 14 cm i namoče se u miliQ vodi kroz naredna 3 – 4 sata. Voda, u kojoj su namočene membrane, promijeni se 3 puta kako bi se isprali tragovi glicerola s istih. Nakon pripreme membrane je potrebno narolati i zakačiti štipaljkom s jedne strane, dodati 30 mL uzorka nanoselena te narolati i zakačiti štipaljkom s druge strane. Membrane moraju biti u cijelosti ispunjene tekućinom, stoga je prilikom dodavanja uzorka važno paziti da unutar membrana ne ostanu mjehurići zraka. Napunjene membrane uranjaju se u čaše zapremine 1000 mL ispunjene miliQ vodom te se čaše zatim postave na magnetsku miješalicu s velikim magnetskim mješačima. Dijalizijske membrane moraju biti jednako udaljene od magnetske miješalice i potpuno uronjene u vodu kako je prikazano na *Slici 7*. Proces dijalize traje naredna 24 h tijekom kojih je potrebno promijeniti vodu u kojoj se nalaze membrane minimalno tri puta. Uzorak čestica nanoselena prenosi se iz dijalizijskih membrana u tikvice s okruglim dnom te se podvrgava daljnjim postupcima.



Slika 7: Prikaz dijalize nanoselena (Fotografija: Karla Vitlov)

Nakon provedene dijalize sintetiziranih uzoraka nanoselena isti se uparavaju na rotavaporu. Prethodno dobivena reakcijska smjesa sadržava čestice nanoselena, ali i sva otapala korištena prilikom sinteze. Kako bi se čestice nanoselena mogle podvrgnuti daljnjim ispitivanjima sintetizirani uzorak potrebno je ukoncentrirati. Početni volumeni prije procesa uparavanja i konačni volumeni nakon procesa uparavanja svakog pojedinačnog uzorka prikazani su u *Tablici 3*.

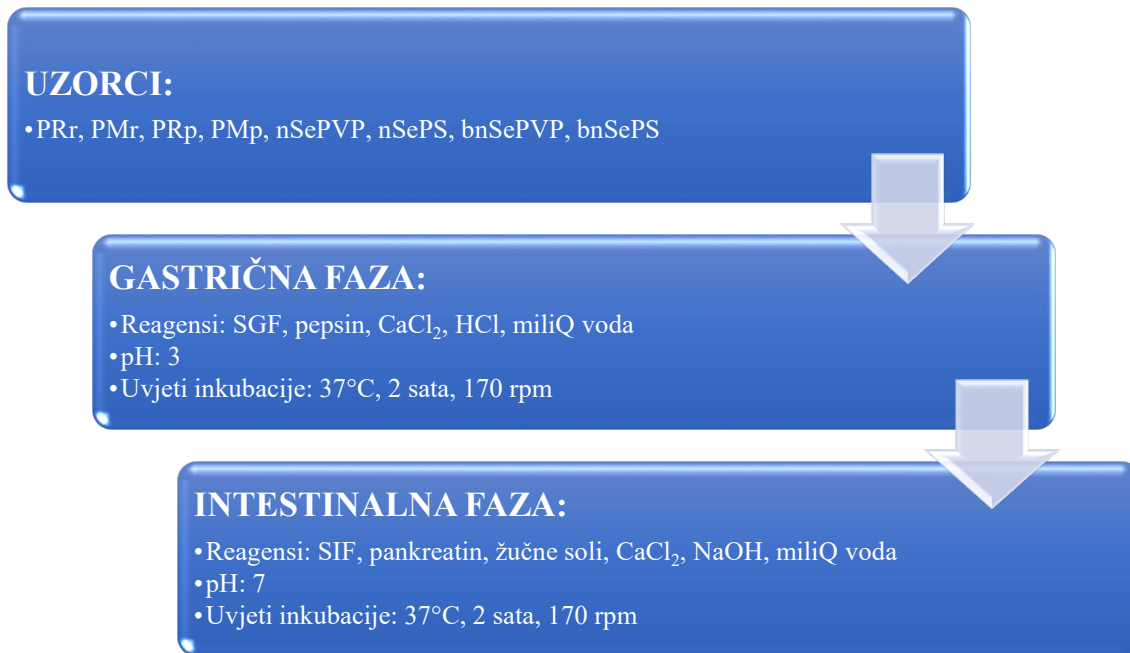
Tablica 3: Volumeni uzoraka prije uparavanja i volumeni uzoraka nakon uparavanja

Kratica uzorka	Ukupni volumen nakon sinteze (mL)	Volumen nakon uparavanja na rotavaporu (ml)
PR _r	29	5
PM _r	29	2
PR _p	14,5	2
PM _p	14,5	2
nSePVP	14,5	2
nSePS	30	10
bnSePVP	30	10
bnSePS	30	10

PR_r – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom rajčice; *PM_r* – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom mandarine; *PR_p* – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom rajčice; *PM_p* – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom mandarine; *nSePVP* – sintetski nanoselen inkapsuliran polivinilpirolidonom; *nSePS* – sintetski nanoselen inkapsuliran polisorbitom; *bnSePVP* – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polivinilpirolidonom; *bnSePS* – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polisorbitom

3.6. Simulacija gastrointestinalne (GI) digestije

Kako bi se ispitala gastrointestinalna stabilnost nanoselena prethodno sintetizirani uzorci podvrgnuti su standardiziranoj *in vitro* metodi simulacije digestije. Metoda GI digestije korištena u ovom istraživanju temeljila se na radu Minekus i sur., (2014) uz određene modifikacije. Statički model GI digestije oponaša fiziološke uvjete u gastrointestinalnom traktu kojima su izložene oralno unesene tvari. Model korišten u ovom istraživanju sastoji se od dva sukcesivna koraka. Prvi korak simulira želučane uvjete, dok drugi korak simulira uvjete u dvanaesniku odnosno tankom crijevu. U svakom navedenom koraku ispitivanim uzorcima dodane su sintetizirane gastrointestinalne tekućine, otopine enzima, soli, kiselina i lužina karakterističnih za svaku pojedinačnu fazu digestije. Također, pH je optimiziran nakon svakog sukcesivnog koraka. Kako bi simulirana GI digestija bila sličnija fiziološkim uvjetima, reakcijske smjese inkubiraju se u vodenoj kupelji na 37°C tijekom 2 sata uz stalno miješanje brzinom od 170 rpm. Shematski prikaz digestije prikazan je na *Slici 8*.



Slika 8: Shematski prikaz procesa digestije

PRr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom rajčice; PMr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom mandarine; PRp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom rajčice; PMp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom mandarine; nSePVP – sintetski nanoselen inkapsuliran polivinilpirolidonom; nSePS – sintetski nanoselen inkapsuliran polisorbatom; bnSePVP – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polivinilpirolidonom; bnSePS – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polisorbatom

3.6.1. Priprema reagensa

- SGF otopina (simulated gastric fluid (25 000 U mL⁻¹)): pomiješati 8,625 mL KCl, 1,125 mL K₂HPO₄, 15,625 mL NaHCO₃, 14,75 mL NaCl, 0,5 mL MgCl₂(H₂O)₆, 0,625 mL CH₅NO₃ i 1,625 mL HCl (6M) u odmjernu tikvicu od 500 mL i nadopuniti miliQ vodom do oznake. pH vrijednost otopine podesi se na 3 pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl.
- SIF otopina (simulated intestinal fluid (800 U mL⁻¹)): pomiješati 8,5 mL KCl, 1 mL K₂HPO₄, 53,125 mL NaHCO₃, 12 mL NaCl, 1,375 mL MgCl₂(H₂O)₆ i 0,875 mL HCl (6 M) u odmjernu tikvicu od 500 mL i nadopuniti miliQ vodom do oznake. pH vrijednost otopine podesi se na 7 pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl.
- CaCl₂(H₂O)₂ (0,3 M): izvagati 4,41 g CaCl₂ i otopiti u 100 mL miliQ vode
- Pepsin: izvagati 50 mg pepsina i otopiti u 1 mL SGF otopine

- Pankreatin: izvagati 8 mg pankreatina i otopiti u 1 mL SIF otopine
- Žučne soli: izvagati 65,37 mg žučnih soli i otopiti u 1 mL miliQ vode
- NaOH (1 M): izvagati 4 g NaOH i otopiti u 100 mL miliQ vode

3.6.2. Postupak provođenja gastrične faze digestije

U Falcon kivete pomiješa se 600 μL prethodno pripremljenog uzorka s 1875 μL SGF otopine, 400 μL svježe pripremljenog pepsina, 1,25 μL CaCl_2 (0,3 M) i 50 μL HCl (1 M). Zatim je potrebno provjeriti pH pripremljene otopine i podesiti ga na 3 pomoću HCl (6 M). pH otopine optimizira se pH-metrom s kombiniranom staklenom elektrodom. U otopinu se naposljetku dodaje 174 μL miliQ vode. Uz pripremu reakcijskih smjesa za gastričnu fazu digestije paralelno se priprema i slijepa proba na isti način, osim što je u otopinu umjesto uzorka potrebno staviti isti volumen miliQ vode. Potom se Falcon kivete dobro zatvore parafilmom, a sadržaj se homogenizira na Vortex miješalici. Tako pripremljene reakcijske smjese i slijepa proba prenose se u termostatiranu kupelj s mućkalicom. Uzorci se inkubiraju na 37°C tijekom 2 sata uz stalno miješanje brzinom od 170 rpm.

3.6.3. Postupak provođenja intestinalne faze digestije

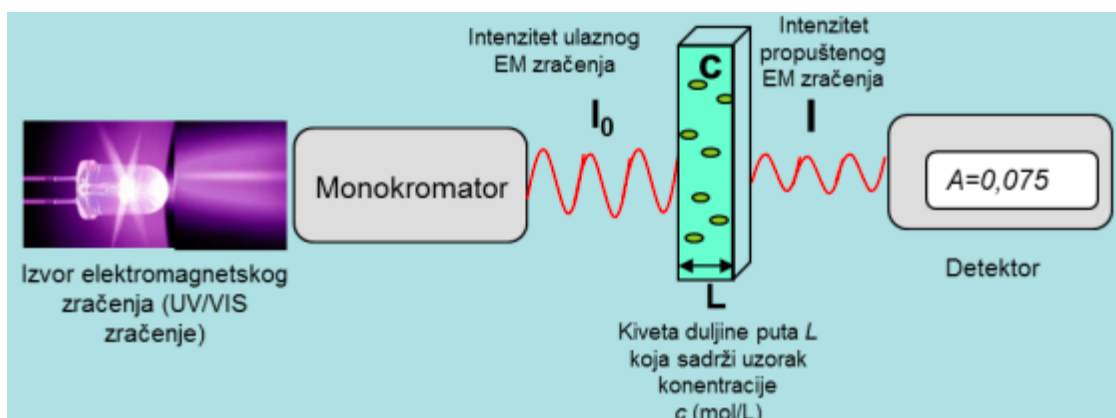
Reakcijskim smjesama i slijepoj probi nakon provođenja gastrične faze digestije dodaje se 2750 μL SIF otopine, 1250 μL svježe pripremljenog pankreatina, 625 μL žučnih soli, 10 μL CaCl_2 (0,3 M) i 37,5 μL NaOH (1 M). Zatim je potrebno provjeriti pH pripremljene otopine i podesiti ga na 7 pomoću NaOH (1 M). pH otopine optimizira se pH-metrom s kombiniranom staklenom elektrodom. U otopinu se naposljetku dodaje 328 μL miliQ vode. Potom se Falcon kivete dobro zatvore parafilmom, a sadržaj se homogenizira na Vortex miješalici. Tako pripremljene reakcijske smjese i slijepa proba prenose se u termostatiranu kupelj s mućkalicom. Uzorci se inkubiraju na 37°C tijekom 2 sata uz stalno miješanje brzinom od 170 rpm.

3.7. UV-Vis spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nanoselena

UV-Vis spektrofotometrija je analitička metoda koja se koristi za kvantitativno određivanje sadržaja uzoraka. Osnovni princip rada ove metode je apsorpcija elektromagnetskog zračenja određene valne duljine u kojoj je energija takvog zračenja proporcionalna valnoj duljini. Ultraljubičasti dio spektra obuhvaća valne duljine u rasponu 190 – 380 nm, a vidljivi dio spektra

obuhvaća valne duljine u rasponu 380-800 nm. Analizirani uzorak apsorbira zračenje i njegovi elektroni prelaze iz osnovnog u pobuđeno energetska stanje. Pobuđeno energetska stanje je nestabilno i elektroni se vraćaju u osnovno stanje uz emisiju energije (Picollo i sur., 2018).

Spektrofotometar je uređaj kojim se provodi analiza uzorka, a njegovi osnovni dijelovi prikazani su na *Slici 9*. Sastoji se od izvora elektromagnetskog zračenja, monokromatora koji na uzorak propušta svjetlost određene valne duljine, kivete koja služi kao nosač uzorka i detektora koji mjeri intenzitet propuštenog zračenja izražen kao apsorbancija.



Slika 9: Shematski prikaz spektrofotometra (Preuzeto s: <https://repositorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A402/datastream/PDF/view>)

Beer-Lambertov zakon je matematički izraz koji služi za izražavanje koncentracije tvari u mjerenom uzorku i glasi:

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon cl$$

A je apsorbancija uzorka izmjerena na određenoj valnoj duljini i jednaka je logaritmu omjera ulaznog zračenja (I_0) i izmjerenog zračenja (I). ϵ je molarni apsorpcijski koeficijent ($L/mol\ cm$), l je duljina puta kroz uzorak (cm), a c je molarna koncentracija tvari u mjerenom uzorku (mol/L). Iz prikazane formule vidljivo je da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji mjerene tvari u uzorku. Linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji nanoselena upotrijebljena je u analizi

sintetiziranih uzoraka nanoselena čije čestice zbog karakteristične crvene boje apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra (Fardsadegh i Jafarizadeh-Malmiri, 2019).

3.7.1. Postupak izrade baždarnih dijagrama na 340 nm i 405 nm

Nanoselen u vidljivom spektru pokazuje dva apsorpcijska maksimuma, na 340 i 405 nm. U svrhu istraživanja mogućnosti spektrofotometrijske kvantifikacije nano oblika selena u reakcijskoj smjesi napravljeni su baždarni dijagrami ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nanoselena u smjesi nakon provedbe čišćenja uzorka nanoselena dijalizom, a uz pretpostavku 100%-tne konverzije selenita u elementarni selen.

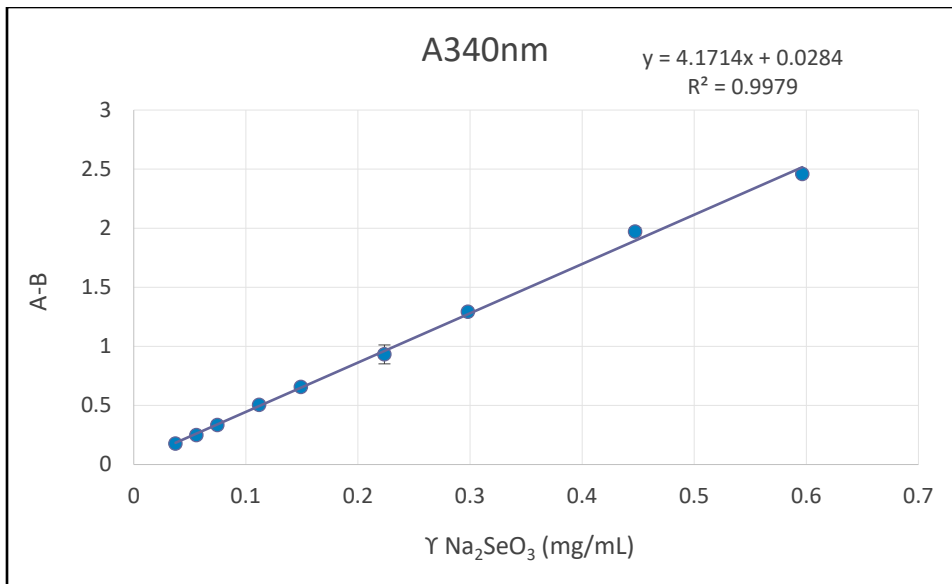
Kao ishodišna otopina za izradu baždarnih dijagrama upotrijebljena je otopina uzorka nSePVP iz kojeg je pripremljen je koncentracijski niz otopina razrjeđivanjem s miliQ vodom (*Tablica 4*).

Tablica 4: Izrada koncentracijskog niza otopina

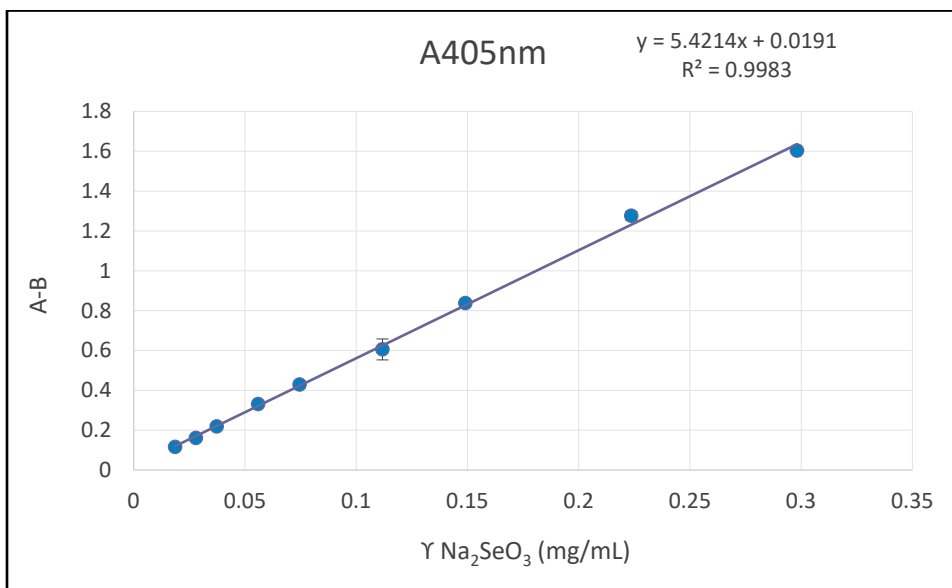
Oznaka uzorka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	B
Koncentracija (Na ₂ SeO ₃) / mg mL ⁻¹	0,596	0,447	0,298	0,224	0,149	0,112	0,075	0,056	0,037	0,028	0,019	0
V uzorka / μL	200	150	100	75,2	50	37,6	25,2	18,8	12,4	9,4	6,4	0
V miliQ H ₂ O / μL	0	50	100	124,8	150	162,4	174,8	181,2	187,6	190,6	193,6	200

slijepa proba

Uzorci se pipetiraju u triplikatu na ploču s jažicama volumena 200 μL; ploča s uzorcima stavlja se u čitač mikrotitarskih ploča i vrši se mjerenje na 2 valne duljine od 340 nm i 405 nm. Nakon statističke obrade rezultata dobivena su dva baždarna dijagrama na 340 nm (*Slika 10*) i 405 nm (*Slika 11*).



Slika 10: Baždarni dijagram otopine uzorka nSePVP na 340 nm



Slika 11: Baždarni dijagram otopine uzorka nSePVP na 405 nm

3.7.2. Postupak provođenja UV-Vis spektrofotometrijskog mjerenja

Mjerenje koncentracija nanoselena u analiziranim uzorcima provedeno je na način da je 600 μL uzorka razrijeđeno je s 3100 μL miliQ vode. Kao slijepa proba korištena je miliQ voda. Po dvije paralele svakog pojedinačnog uzorka nakon provedene gastrične i intestinalne digestije pipetirane su na ploču s jažicama u volumenu od 200 μL u duplikatu ($n=4$). Jedna paralela pripadajuće slijepa probe pipetirana je u četverplikatu.

3.8. Statistička analiza

Sve analize provedene su u četverplikatu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardne devijacije. Analiza navedenih podataka i izrada grafičkih prikaza provedena je pomoću Microsoft Office Excel i GraphPad Prism 9 programskog paketa. Dobiveni rezultati uspoređeni su korištenjem jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) s post hoc Tukey testom, a vrijednosti $p \leq 0,05$ pokazuje statistički značajnu razliku između uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija UV-Vis spektrofotometrije

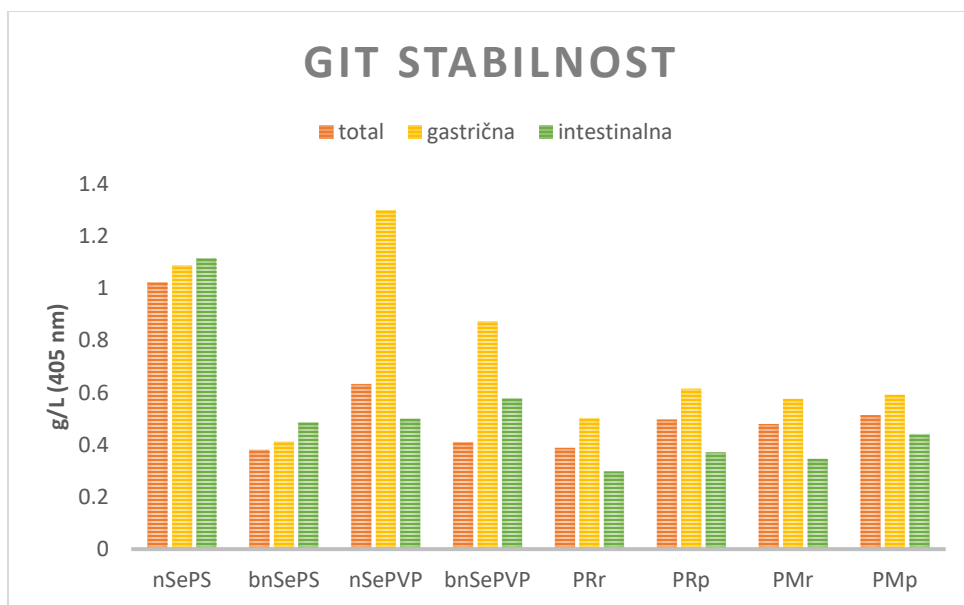
Sintetizirane čestice nanoselena analizirane su metodom UV-Vis spektrofotometrije na dvije valne duljine od 340 nm i 405 nm. Usporedbom baždarnih dijagrama prikazanima na *Slici 10* i *Slici 11* i koeficijenta korelacije dobivenih jednadžbi pravaca vidljivo je da na obje valne duljine postoji linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji nanoselena (R^2 340 nm=0.9979; R^2 405 nm=0.9983) međutim, veća osjetljivost postiže se na valnoj duljini od 405 nm. Stoga su sva mjerenja u ovom istraživanju provedena na 405 nm.

Svi naredno prikazani rezultati mjerenja i analiza stabilnosti čestica nanoselena obrađeni su na valnoj duljini od 405 nm.

4.2. Gastrointestinalna stabilnost čestica nanoselena

U ovom radu istražena je gastrična i intestinalna stabilnost nanočestica selena sintetiziranih primjenom različitih inkapsulacijskih/redukcijskih sredstava.

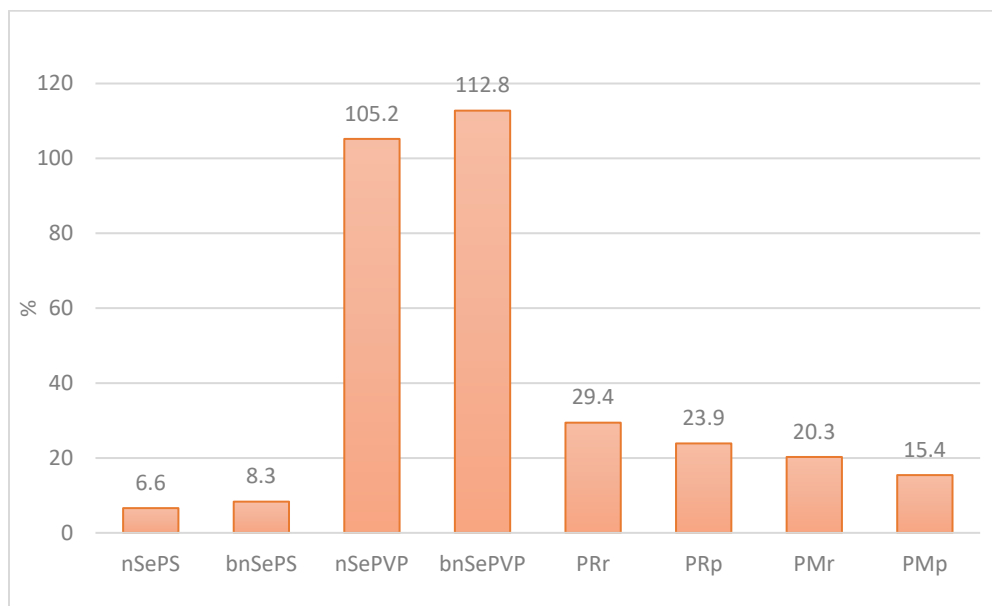
Mjerenjem apsorbancije na karakterističnoj valnoj duljini dobivene su koncentracije gastrostabilnog nanoselena koje su izražene kao koncentracija (g/L) (*Slika 12*).



Slika 12: Prikaz gastrointestinalne stabilnosti istraživanih uzoraka.

GIT- gastrointestinalna, total – koncentracija nanoselena prije simulacije probave; gastrična – koncentracija nanoselena nakon simulacije probave u želucu; intestinalna – koncentracija nanoselena nakon simulacije probave u tankom crijevu; nSePS – sintetski nanoselen inkapsuliran polisorbatom; bnSePS – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polisorbatom; nSePVP – sintetski nanoselen inkapsuliran polivinilpirolidonom; bnSePVP – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polivinilpirolidonom; PRr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom rajčice; PRp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom rajčice; PMr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom mandarine; PMp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom mandarine

Relativna promjena koncentracije nanoselena tijekom gastrične digestije izračunata u odnosu na početnu koncentraciju (total) prikazana je na *Slici 13*.



Slika 13: Promjene koncentracije nanoselena u analiziranim uzorcima nakon simulacije gastrične probave.

nSePS – sintetski nanoselen inkapsuliran polisorbatom; bnSePS – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polisorbatom; nSePVP – sintetski nanoselen inkapsuliran polivinilpirolidonom; bnSePVP – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polivinilpirolidonom; PRr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom rajčice; PRp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom rajčice; PMr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom mandarine; PMp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom mandarine

Kao što je prikazano na *Slici 12*, koncentracije nanoselena u gastričnoj frakciji, nakon provedene digestije kretale su se od 0,4 g/L (bnSePS) do najviše 1,3 g/L (nSePVP).

Usporedbom koncentracija nanoselena u originalnim uzorcima i uzorcima nakon provedene gastrične digestije vidljivo je povećanje koncentracije nanoselena u svim istraživanim uzorcima, bez obzira na upotrijebljeno inkapsulacijsko sredstvo.

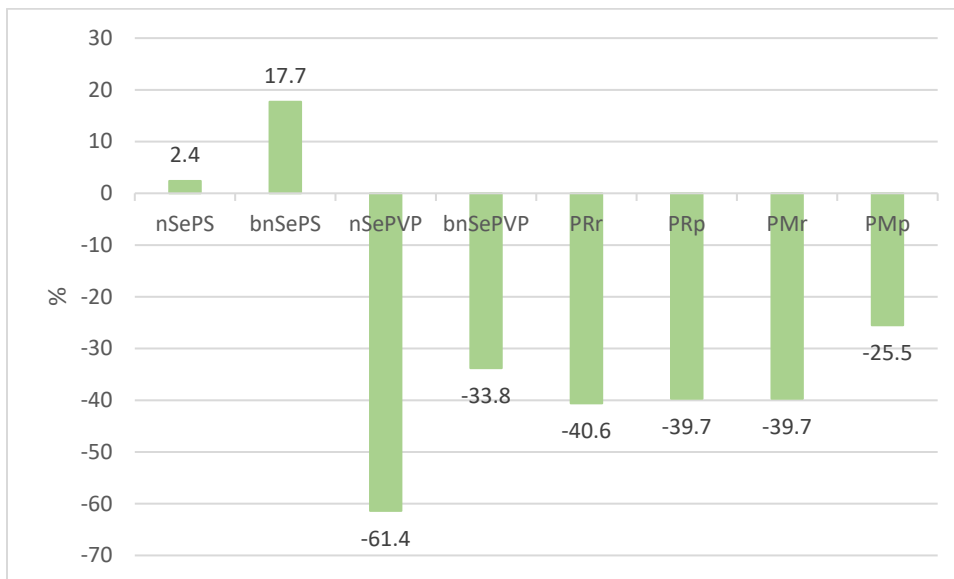
S obzirom na to da su analizirani uzorci nakon sinteze dijalizirani te nisu sadržavali ostatke anorganskog selena ili redukcijskog sredstva, navedeno opažanje najvjerojatnije je posljedica

raspada većih nanočestica na čestice manjeg promjera, čime im se povećava broj u reakcijskoj smjesi, a stoga i apsorbancija. Iako navedeno opažanje ukazuje na nestabilnost sustava u uvjetima niskog pH, važno je primijetiti da selen ipak nastavlja egzistirati u nano-obliku (odnosno u elementarnom stanju). Također, smanjenje promjera nanočestice može ukazivati na povećanje biodostupnosti. Naime, nanočestice promjera manjeg od 100 ili 200 nm imaju značajno bolju bioraspoloživost od većih nanočestica (Wang i sur., 2020). S druge strane, manje nanočestice su često i toksičnije stoga je za procjenu značaja ovog učinka nužno provesti dodatna istraživanja mjerenja promjera nanočestica. Najveći porast apsorbancije primijećen je kod nanočestica nSePVP ili bnSePVP (porast koncentracije nanočestica redom 105% i 113%) što ukazuje na njihovu najveću nestabilnost u uvjetima želuca. Ostale nanočestice pokazale su bolju stabilnost kod kiselog pH te je koncentracija porasla u rasponu od 6,7% (nSePS) do 29,4% (PRr). Dodatak komine masline u reakcijsku smjesu, nije značajno utjecao na gastričnu stabilnost uzoraka inkapsuliranih PS-om ili PVP-om što je vidljivo iz međusobne usporedbe uzoraka nSePS i bnSePS te nSePVP i bnSePVP primjenom Studentovog t-testa gdje je utvrđeno da opažene razlike nisu statistički značajne. S obzirom na to da je u okviru preliminarnih istraživanja utvrđeno kako se dodatkom EKM u reakcijsku smjesu poboljšavaju funkcionalna svojstva nastalih nanočestica (primarno njihova reduktivna i antiradikalna sposobnost) podatak o tome da EKM ne utječe negativno na gastričnu stabilnost nastalih sustava dodatno govori u prilog njegovoj primjeni u biogenoj sintezi nanoselena.

Usporedbom različitih pektina kao prirodnih inkapsulacijskih sredstava u sintezi nanoselena utvrđeno je kako oni pokazuju različite, ali usporedive učinke na gastričnu stabilnost nanoselena. Promjene koncentracija biogenog nanoselena inkapsuliranog pektinima mijenjale su se od 15,4 % (PMp) do 29,4% (PRr) pri čemu je pektin iz kore mandarine rezultirao nastankom stabilnijih nanočestica (u odnosu na pektin rajčice), a veća stabilnost postignuta je korištenjem pročišćenih frakcija pektina (u odnosu na nepročišćene frakcije).

Nakon provedene intestinalne digestije koncentracije nanoselena kretale su se od 0,30 g/L (PRr) do 1,1 g/L (nSePS) (*Slika 12*). U većini analiziranih uzoraka koncentracije nanoselena nakon provedene intestinalne digestije bile su značajno manje nego nakon provedbe gastrične digestije, osim u uzorcima inkapsuliranim PS-om (nSePS i bnSePS) gdje nije došlo do statistički značajnih promjena. Promjene u koncentraciji nanoselena koje su se dogodile tijekom simulacije probave u

tankom crijevu (a izračunate u odnosu na koncentracije prisutne nakon gastrične digestije) prikazane su na *Slici 14*.



Slika 14: Promjene koncentracije nanoselena u analiziranim uzoraka nakon simulacije intestinalne probave

nSePS – sintetski nanoselen inkapsuliran polisorbatom; bnSePS – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polisorbatom; nSePVP – sintetski nanoselen inkapsuliran polivinilpirolidonom; bnSePVP – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polivinilpirolidonom; PRr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom rajčice; PRp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom rajčice; PMr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom mandarine; PMp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom mandarine

Sa *Slike 14* vidljiv je različit trend promjena nanočestica inkapsuliranih polisorbatom u odnosu na sve ostale nanočestice. Koncentracija nanočestica nSePS nije se značajno promijenila u uvjetima tankog crijeva, dok je kod bnSePS nanočestica došlo do povećanja koncentracije, vjerojatno zbog razgradnje većih nanočestica na manje.

Kod svih ostalih uzoraka zamjetno je značajno smanjenje koncentracija nanočestica, nakon što su bile podvrgnute simulaciji digestije u tankom crijevu. Navedena promjena može biti posljedica ili potpunog raspada nanočestica i oksidacije elementarnog Se ili nastajanja aglomerata zbog utjecaja alkalnog pH i žučnih soli. Najnestabilnije su čestice inkapsulirane polivinilpirolidonom te se njihova koncentracija u tankom crijevu smanjila za više od 60%. Dodatkom EKM u reakcijsku smjesu dobivene su nanočestice značajno otpornije prema intestinalnim uvjetima.

Nanočestice selena inkapsulirane pektinima rajčice i mandarine također su se dijelom raspadale/aglomerirale u uvjetima tankog crijeva. Najmanje se smanjio udio nanočestica inkapsuliranih pročišćenim pektinom iz kore mandarine (25,5%), dok su ostale čestice inkapsulirane pektinima bile nestabilnije te su utvrđena smanjenja koncentracije u rasponu od 39,7%-40,6%.

Istraživanja stabilnosti nanočestica u uvjetima probavnog trakta relativno su malobrojna, a bioraspoloživost selena u obliku nanočestica vrlo je slabo istražena.

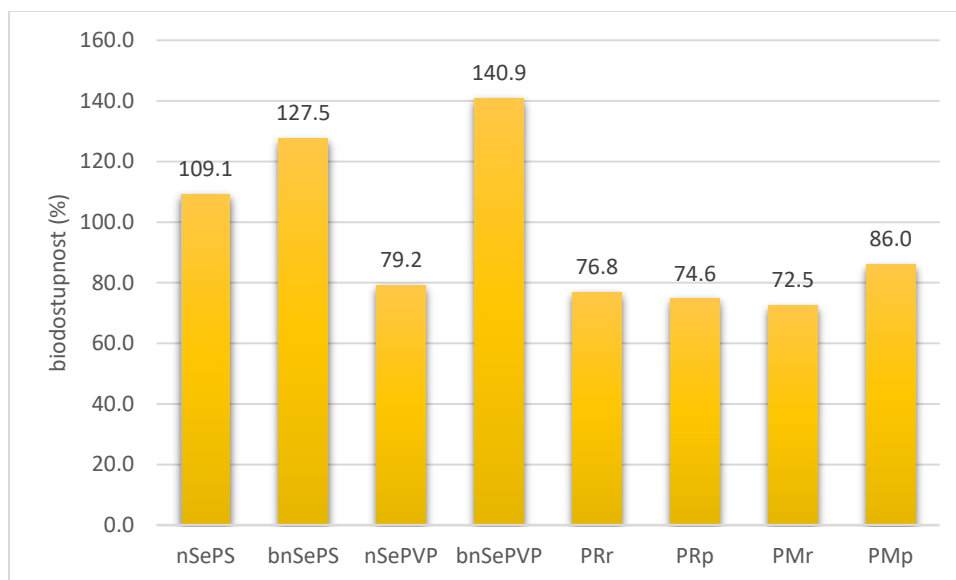
Huang i sur., (2019) u svom radu analiziraju nanočestice resveratrola s proteinima izoliranim iz kukuruza uz upotrebu pektina iz kore citrusa kao inkapsulacijskog sredstva. Takve nanočestice podvrgnute su simuliranoj gastrointestinalnoj digestiji. Analizom nanočestica u različitim fazama digestije zaključeno je kako su nanočestice s pektinom kao inkapsulacijskim sredstvom podložne degradaciji u obje faze digestije što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Naime, selenove nanočestice s pektinom kao inkapsulacijskim sredstvom analizirane u ovom radu pokazuju isti trend degradacije nakon gastrične digestije, dok nakon intestinalne digestije pokazuju podložnost aglomeraciji. Sun i sur., (2020) istražili su gastrointestinalnu stabilnost nanočestica kurkumina s karagenanom i polisorbitom kao inkapsulacijskim sredstvima te i oni zaključuju kako su takve nanočestice podložne degradaciji u obje faze digestije. Takvi rezultati sukladni su rezultatima ovog istraživanja u kojem nanočestice s polisorbitom kao inkapsulacijskim sredstvom također pokazuju podložnost degradaciji nakon gastrične i intestinalne digestije.

Sadržaj čestica nanoselena nakon provedene gastrointestinalne digestije u ovom istraživanju procijenjen je primjenom spektrofotometrije u vidljivom području. Promjene apsorbancije ukazuju na promjenu koncentracije nanočestica u sustavu, pri čemu porast apsorbancije ukazuje na raspad postojećih nanočestica na manje, a smanjenje apsorbancije na potpunu degradaciju i oksidaciju elementarnog nanoselena ili aglomeraciju manjih u veće nanočestice. Stoga je za dobivanje

detaljnijeg uvida nužno kombinirati spektrofotometrijsko određivanje s točnijim/selektivnijim metodama određivanja (raspodjele) veličine nanočestica – metodom diferencijalnog raspršenja svjetlosti ili metodama elektronske mikroskopije.

4.3. Biodostupnost nanočestica selena

Biodostupna frakcija lijeka/dodatka prehrani/nutrijenta podrazumijeva onu njegovu količinu koja nakon procesa probave dospije do mjesta apsorpcije (epitela tankog crijeva). Stoga je, uz pretpostavku ekvivalentne apsorpcije nanočestica selena različite veličine, moguće na temelju dobivenih rezultata procijeniti biodostupnost analiziranih nanočestica. Dobiveni rezultati prikazani su na *Slici 15*. Sa slike je vidljivo da je usprkos značajnim promjenama koje su se dogodile tijekom procesa probave, biodostupnost analiziranih čestica zadovoljavajuća te se kreće od 72,5 % (PMr) do 140,9% (bnSePVP). Najveću biodostupnost imale su nanočestice sintetizirane primjenom sintetskih inkapsulacijskih sredstava, a osobito kada su ta inkapsulacijska sredstva kombinirana s ekstraktom komine masline. Adhezija polifenola iz EKM na površinu selenovih nanočestica rezultirala je boljom stabilnošću u uvjetima probavnog trakta, vjerojatno sprječavanjem aglomeracije u tankom crijevu.



Slika 15: Biodostupnost analiziranih nanočestica selena

nSePS – sintetski nanoselen inkapsuliran polisorbitom; bnSePS – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polisorbitom; nSePVP – sintetski nanoselen inkapsuliran polivinilpirolidonom; bnSePVP – biogeni nanoselen inkapsuliran ekstraktom komine masline i polivinilpirolidonom; PRr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom rajčice; PRp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom rajčice; PMr – biogeni nanoselen inkapsuliran sirovim pektinom mandarine; PMp – biogeni nanoselen inkapsuliran pročišćenim pektinom mandarine

Biogene nanočestice inkapsulirane pektinima pokazale su nižu, ali zadovoljavajuću biodostupnost koja se kretala od 72,5% do 86%. Pri tome odabir vrste pektina, kao ni odabir sirove/pročišćene frakcije nije značajno utjecao na biodostupnost, s iznimkom pročišćene frakcije pektina iz kore mandarine za koju je zabilježena statistički značajno veća biodostupnost u odnosu na ostale uzorke s pektinima.

5. ZAKLJUČCI

- Kiseli uvjeti u gastričnoj fazi digestije ($\text{pH} = 3$) i prisutnost pepsina uzrokuju povećanje koncentracije nanočestica selena neovisno o korištenom inkapsulacijskom sredstvu pri čemu najviše raste koncentracija nanočestica inkapsuliranih polivinilpirolidonom (nSePVP i bnSePVP).
- Porast koncentracije nanočestica rezultat je raspada većih nanočestica na manje.
- Dodatak komine masline u reakcijsku smjesu (koji rezultira povećanjem antioksidativne aktivnosti nanočestica) nije značajno utjecao na gastričnu stabilnost uzoraka inkapsuliranih PS-om ili PVP-om (bnSePS ili bnSePVP).
- Koncentracije čestica nanoselena inkapsuliranih pektinima porasle su tijekom gastrične probave. Pektin iz kore mandarine i pročišćene frakcije pektina rezultirale su nastankom stabilnijih nanočestica.
- Tijekom intestinalne faze probave ($\text{pH} = 7$, prisustvo pankreatina i žučnih soli) dolazi do značajnog smanjenja koncentracije nanočestica selena u odnosu na koncentracije prisutne u gastričnoj frakciji, neovisno o korištenom inkapsulacijskom sredstvu. Jedina iznimka su nanočestice inkapsulirane polisorbatom (nSePS i bnSePS) gdje nije došlo do značajnih promjena u koncentraciji ili je ona dodatno povećana.
- Razlog smanjenja koncentracije nanočestica može biti ili aglomeracija postojećih nanočestica ili oksidacija elementarnog nanoselena.
- U uvjetima tankog crijeva najnestabilnije su čestice inkapsulirane polivinilpirolidonom te se njihova koncentracija u tankom crijevu smanjila za više od 60%. Dodatkom EKM u reakcijsku smjesu dobivene su nanočestice značajno otpornije prema intestinalnim uvjetima.
- Nanočestice selena inkapsulirane pektinima rajčice i mandarine također su se dijelom raspadale/aglomerirale u uvjetima tankog crijeva, ali u puno manjoj mjeri (25,5% -40,6%).
- Biodostupnost svih analiziranih čestica bila je zadovoljavajuća i kretala se od 72,5% (PMr) do 140,9% (bnSePVP).
- Za detaljnije istraživanje utjecaja probave na svojstva nanočestica selena nužno je kombinirati spektrofotometrijsko određivanje s točnijim/selektivnijim metodama određivanja (raspodjele) veličine nanočestica – metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti ili metodama elektronske mikroskopije.

6. LITERATURA

- Barceloux DG. Selenium. U: *Clinical Toxicology*. Topanga, Marcel Dekker, 1999, str. 145–172.
- Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 2020, 25, 1–15.
- Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. *J. Endocrinol*, 2005, 184, 455–465.
- De Bruno A, Romeo R, Fedele FL, Sicari A, Piscopo A, Poiana M. Antioxidant activity shown by olive pomace extracts. *J. Environ. Sci. Health B J ENVIRON SCI HEAL B*, 2018, 53, 526–533.
- Čepo VD, Radić K, Jurmanović S, Jug M, Grdić Rajković M, Pedisić S, Moslavac T, Ibahari P. Valorization of olive pomace-based nutraceuticals as antioxidants in chemical, food, and biological models. *Molecules*, 2018, 23, 2070.
- Chin KY, Ima-Nirwana S. Olives and bone: A green osteoporosis prevention option. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2016, 13, 1–11.
- Cui D, Liang T, Sun L, Meng L, Yang C, Wang L, Liang T, Li Q. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharm. Biol.*, 2018, 56, 528–534.
- Difonzo G, Troilo M, Squeo G, Pasqualone A, Caponio F. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods. *J. Sci. Food Agric.*, 2021, 101, 15–26.
- Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64, 557–570.
- Fardsadegh B, Jafarizadeh-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.

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.

Huang X, Liub Y, Zoub Y, Liangb X, Pengb Y, McClements DJ, Hu K. Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion. *Food Hydrocoll.*, 2019, 93, 261–269.

Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 2013, 19, 3292–3311.

Mellinas C, Jiménez A, Del Carmen Garrigós M. Microwave-assisted green synthesis and antioxidant activity of selenium nanoparticles using *Theobroma cacao* L. bean shell extract. *Molecules*, 2019, 24, 4048.

Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carriere F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Menard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Brodtkorb A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food Funct.*, 2014, 5, 1113–1124.

Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008, 11, 266–277.

Murugesan G, Nagaraj K, Sunmathi D, Subramani K. Methods involved in the synthesis of selenium nanoparticles and their different applications. *European j. biomed. pharm.*, 2019, 6, 189–194.

Picollo M, Aceto M, Vitorino T. UV-Vis spectroscopy. *Phys. Sci. Rev.*, 2019, 4, 1–14.

Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 2000, 356, 233–241.

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

Spektrofotometar, <https://repositorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A402/datastream/PDF/view>, pristupljeno 04. 08. 2021.

Sun X, Pan C, Ying Z, Yu D, Duan X, Huang F, Ling J, Ouyang X. Stabilization of zein nanoparticles with k-carrageenan and tween 80 for encapsulation of curcumin. *Int. J Biol. Macromol.* 2020, 146, 549–559.

Tang HY, Huang Q, Wang YL, Yang XQ, Su DX, He S, Tan JC, Zeng QZ, Yuan Y. Development, structure characterization and stability of food grade selenium nanoparticles stabilized by *tilapia* polypeptides. *J. Food Eng.*, 2020, 275, 109878.

Thakur BR, Singh RK, Handa AK, Rao MA. Chemistry and uses of pectin. *Food Sci. Nutr*, 2009, 37, 47–73.

Vahdati M, Tohidi Moghadam T. Synthesis and characterization of selenium nanoparticles-lysozyme nanohybrid system with synergistic antibacterial properties. *Sci. Rep.*, 2020, 10, 1–10.

Wang Y, Pi C, Feng X, Hou Y, Zhao L, Wei Y. The influence of nanoparticle properties on oral bioavailability of drugs. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15, 6295–6310.

Wójcik-Pastuszka D, Potempa A, Musiał W. Bipolymeric pectin millibeads doped with functional polymers as matrices for the controlled and targeted release of mesalazine. *Molecules*, 2020, 25, 5711.

Zaitseva O, Khudyakov A, Sergushkina M, Solomina O, Polezhaeva T. Pectins as a universal medicine. *Fitoterapia*, 2020, 146, 104676.

7. SAŽETAK

Selen je esencijalni element, često deficitaran u svakodnevnoj prehrani. Sve se češće preporučuje kao dodatak prehrani u ljekarničkoj praksi, najčešće u obliku selenita ili organskih oblika selena. Zbog potencijalno boljih farmakokinetičkih svojstava, intenzivno se istražuje mogućnost njegove *per os* primjene u obliku nanočestica elementarnog selena. U okviru ovog eksperimentalnog rada istražena je mogućnost zelene sinteze nanoselena korištenjem inkapsulacijskih sredstava izoliranih iz prehrambenog otpada te je ispitana njihova stabilnost i biodostupnost nakon simulirane gastrointestinalne digestije, a u odnosu na kemijski sintetizirane nanočestice. U tu svrhu korišteni su polifenolni ekstrakt komine masline te pročišćene i sirove frakcije pektina izoliranih iz kore mandarine i komine rajčice. Promjena koncentracija čestica nanoselena nakon postupka probave mjerena je primjenom UV-Vis spektrofotometrije. Nakon statističke obrade podataka zaključeno je kako odabir inkapsulacijskog sredstva bitno utječe na gastrointestinalnu stabilnost nanoselena. Nakon gastrične probave koncentracije nanočestica povećavaju se neovisno o korištenom inkapsulacijskom sredstvu. Nakon provedene intestinalne probave dolazi do većeg ili manjeg smanjenja koncentracije zelenih nanočestica ovisno o primijenjenom inkapsulacijskom sredstvu. Iako su kemijski sintetizirane nanočestice inkapsulirane polisorbitom pokazale najbolju gastrointestinalnu stabilnost, biodostupnost svih analiziranih nanočestica bila je zadovoljavajuća i kretala se u intervalu od 72,5% do 140,9%.

SUMMARY:

Selenium is an essential element often deficient in the daily diet. That is why selenium dietary supplements are increasingly recommended in pharmacy practices, most often in the selenite form or organic forms of selenium. Due to potentially better pharmacokinetics properties nano-forms of elemental selenium for oral administration are being extensively researched. In this work green synthesis of nano-selenium particles using food waste isolated encapsulating agents was investigated. The stability and bioavailability of obtained nanoparticles was tested after simulated gastrointestinal digestion and compared to chemically synthesised selenium nanoparticles. Polyphenolic extracts of olive pomace and raw and purified pectin fractions isolated from mandarin peel and tomato pomace were used as encapsulating agents. The concentration change of nano-selenium particles after simulated digestion was measured by UV-Vis spectrophotometry. After statistical analysis it was concluded that the type of the encapsulating agent has a great impact on the gastrointestinal stability of nano-selenium. After gastric digestion, a concentration increase of nanoparticles was noticed, regardless of the used encapsulating agent. After intestinal digestion, the concentration decrease of selenium nanoparticles was observed, and the significance depended on the encapsulating agent used. Although chemically synthesized nanoparticles encapsulated with polysorbate showed the best gastrointestinal stability, the bioavailability of all analyzed nanoparticles was satisfactory and ranged from 72.5% to 140.9%.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRIMJENA FUNKCIONALNIH EKSTRAKTA IZ PREHRAMBENOG OTPADA U SINTEZI NANOČESTICA SELENA – UTJECAJ NA STABILNOST TIJEKOM PROBAVE

Karla Vitlov

SAŽETAK

Selen je esencijalni element, često deficitaran u svakodnevnoj prehrani. Sve se češće preporučuje kao dodatak prehrani u ljekarničkoj praksi, najčešće u obliku selenita ili organskih oblika selena. Zbog potencijalno boljih farmakokinetičkih svojstava, intenzivno se istražuje mogućnost njegove *per os* primjene u obliku nanočestica elementarnog selena. U okviru ovog eksperimentalnog rada istražena je mogućnost zelene sinteze nanoselena korištenjem inkapsulacijskih sredstava izoliranih iz prehrambenog otpada te je ispitana njihova stabilnost i biodostupnost nakon simulirane gastrointestinalne digestije, a u odnosu na kemijski sintetizirane nanočestice. U tu svrhu korišteni su polifenolni ekstrakt komine masline te pročišćene i sirove frakcije pektina izoliranih iz kore mandarine i komine rajčice. Promjena koncentracija čestica nanoselena nakon postupka probave mjerena je primjenom UV-Vis spektrofotometrije. Nakon statističke obrade podataka zaključeno je kako odabir inkapsulacijskog sredstva bitno utječe na gastrointestinalnu stabilnost nanoselena. Nakon gastične probave koncentracije nanočestica povećavaju se neovisno o korištenom inkapsulacijskom sredstvu. Nakon provedene intestinalne probave dolazi do većeg ili manjeg smanjenja koncentracije zelenih nanočestica ovisno o primijenjenom inkapsulacijskom sredstvu. Iako su kemijski sintetizirane nanočestice inkapsulirane polisorbatom pokazale najbolju gastrointestinalnu stabilnost, biodostupnost svih analiziranih nanočestica bila je zadovoljavajuća i kretala se u intervalu od 72,5% do 140,9%.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 15 grafičkih prikaza, 4 tablice i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Glavne riječi: Selen, nanoselen, nanočestice, inkapsulacijska sredstva, stabilnost

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

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Doc. dr. sc. Lovorka Vujić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Prof. dr. sc. Mario Jug, profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Food Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

APPLICATION OF FUNCTIONAL EXTRACTS FROM FOOD WASTE IN SELENIUM NANOPARTICLE SYNTHESIS - EFFECT ON STABILITY DURING DIGESTION

Karla Vitlov

SUMMARY

Selenium is an essential element often deficient in the daily diet. That is why selenium dietary supplements are increasingly recommended in pharmacy practices, most often in the selenite form or organic forms of selenium. Due to potentially better pharmacokinetics properties nano-forms of elemental selenium for oral administration are being extensively researched. In this work green synthesis of nano-selenium particles using food waste isolated encapsulating agents was investigated. The stability and bioavailability of obtained nanoparticles was tested after simulated gastrointestinal digestion and compared to chemically synthesised selenium nanoparticles. Polyphenolic extracts of olive pomace and raw and purified pectin fractions isolated from mandarin peel and tomato pomace were used as encapsulating agents. The concentration change of nano-selenium particles after simulated digestion was measured by UV-Vis spectrophotometry. After statistical analysis it was concluded that the type of the encapsulating agent has a great impact on the gastrointestinal stability of nano-selenium. After gastric digestion, a concentration increase of nanoparticles was noticed, regardless of the used encapsulating agent. After intestinal digestion, the concentration decrease of selenium nanoparticles was observed, and the significance depended on the encapsulating agent used. Although chemically synthesized nanoparticles encapsulated with polysorbate showed the best gastrointestinal stability, the bioavailability of all analyzed nanoparticles was satisfactory and ranged from 72.5% to 140.9%.

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

Thesis includes: 39 pages, 15 figures, 4 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Selenium, nano-selenium, nanoparticles, encapsulating agents, stability

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

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

Lovorka Vujić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mario Jug, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021