

# Primjena polifenola i pektina iz otpada hrane u zelenoj sintezi nanočestica selena

---

**Katelan, Kristina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:163:280074>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Kristina Katelan**

**Primjena polifenola i pektina iz otpada hrane u  
zelenoj sintezi nanočestica selena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 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 svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo, na iznimnoj susretljivosti i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistentici Nikolini Golub na ugodnom društvu, velikoj pomoći i strpljenju prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Posebno hvala mojim roditeljima, bratu i mom Dasenu koji su bili moja snaga i podrška u svakom trenutku i vjerovali u mene i kad sama nisam.*

*Također se zahvaljujem djedu, babi i tetki koje su i same farmaceutkinje te su mi bile uzor pri upisu ovog fakulteta.*

*Na kraju veliko hvala mojim prijateljicama koje su mi studentske dane učinile predivnim periodom života i uz koje je sve bilo lakše.*

## SADRŽAJ:

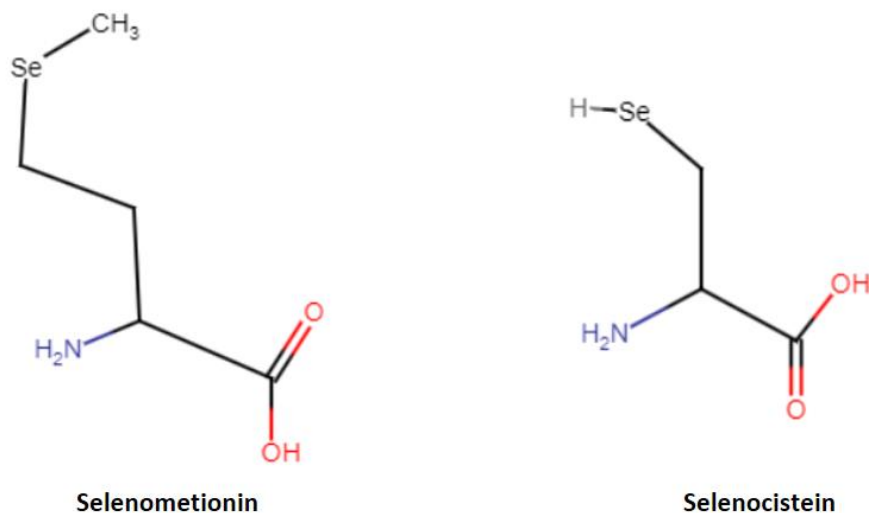
1. UVOD .....	1
1.1. Selen .....	1
1.1.1. Uloga selena u organizmu .....	2
1.2. Nanočestice selena .....	3
1.2.1. Primjena nanoselena u terapijske svrhe .....	5
1.3. Biotpad .....	5
1.3.1. Komina mandarine .....	7
1.3.2. Komina rajčice .....	9
1.3.3. Komina masline.....	10
1.4. Fenolni spojevi .....	11
1.5. Pektini.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	14
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Materijali .....	15
3.1.1. Kemikalije i pribor .....	15
3.1.2. Radni instrumenti i oprema .....	16
3.1.3. Plan eksperimentalnog rada .....	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Priprema suhog ekstrakta komine masline.....	16
3.2.2. Ekstrakcija pektina iz komina mandarine i rajčice.....	17
3.2.3. Priprema otopina pektina i potrebnih kemikalija/reagenasa .....	17
3.2.4. Sinteza nanočestica selena .....	18
3.2.5. Određivanje veličine čestica i koncentracije .....	20
3.2.6. Mjerenje zeta potencijala .....	21
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog potencijala uzoraka TEAC metodom .....	23
3.2.8. Određivanje ukupnog antioksidacijskog potencijala uzoraka Folin-Ciocalteu metodom.....	25
3.2.9. Statistička obrada podataka .....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	27
4.1. Određivanje raspodjele veličine čestica .....	27
4.2. Određivanje zeta potencijala .....	32
4.3. Određivanje antioksidacijskog potencijala uzoraka TEAC metodom .....	34

4.4. Određivanje ukupnog antioksidacijskog potencijala uzoraka Folin-Ciocalteu metodom.....	35
4.5. Procjena stabilnosti uzoraka.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA.....	38
7. POPIS KRATICA, SLIKA I TABLICA.....	43
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	45
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. Selen

Selen (Se) je kemijski element esencijalan za zdravlje živih organizama. Otkrio ga je Jöns Jacob Berzelius 1817. godine pokušavajući otkriti uzrok zagađenja sumporne kiseline koja se proizvodila u jednoj tvornici u Švedskoj. U početku je mislio da se radi o teluriju, ali je na kraju zaključio da je riječ o novom elementu sa svojstvima između sumpora i telurija. Selen se u početku smatrao isključivo toksičnim elementom jer se povezivao sa alkalnom bolesti životinja koje su konzumirale biljke iz tla bogatim selenom, nakon čega bi dolazilo do gubitka dlake i teturanja životinje kao da je slijepa (eng. blind staggers). Krajem 1950. godine otkriveno je da je Se zapravo esencijalni nutrijent za kojega je ustanovljeno da zamjenjuje vitamin E u prehrani štakora i pilića u prevenciji nastajanja vaskularnih, mišićnih i jetrenih lezija. Selen je široko rasprostranjen mineral u prirodi, ali postaje sve rjeđi u hrani zbog intenzivne proizvodnje biljaka. Najveći izvor selena u zemljištu je raspadanje stijena bogatih selenom. Drugi važni izvori su vulkanska aktivnost, gnojiva koja sadrže selen i neke vode. Selen cirkulira kroz hranidbeni lanac živog svijeta. Iz tla ga najprije uzimaju biljke i mikroorganizmi kojima je potreban za rad enzima, te proizvode ispariv dimetilselenid koji ulazi u atmosferu i vraća se na zemlju putem padalina (El-Ramady i sur., 2014; Oldfield, 2002). U prirodi i u organizmima prisutan je u organskim i/ili anorganskim oblicima te rjeđe elementarnom obliku (Se). Glavni organski oblici su selenometionin i selenocistein (Slika 1). Anorganski oblici su selenit ( $\text{SeO}_3^{-2}$ ), selenid ( $\text{Se}^{2-}$ ) i selenat ( $\text{SeO}_4^{-2}$ ) (Mehdi i sur., 2013).

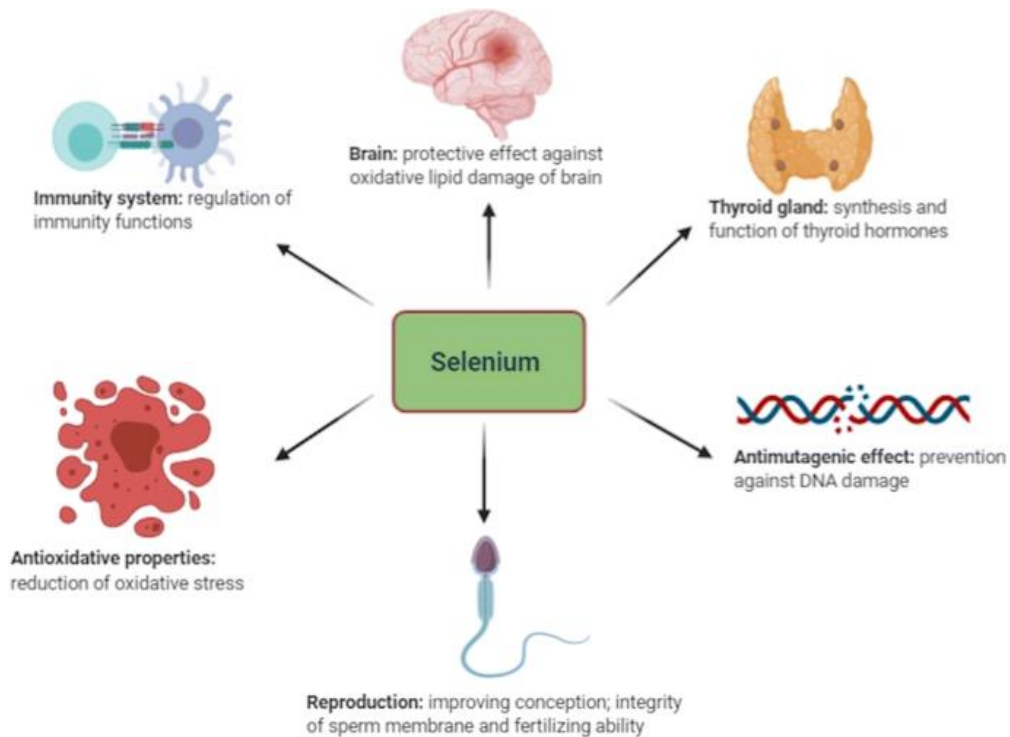


Slika 1. Kemijski oblici organskog selena

### 1.1.1. Uloga selena u organizmu

Selen ima važnu ulogu u staničnom metabolizmu jer je esencijalna komponenta enzima zaslužnih za zaštitu organizma od oksidativnog stresa. U ljudskom organizmu ima 25 do sada poznatih selenoproteina, a među najvažnijima su glutation peroksidaza, tioredoksin reduktaza, dejodinaza i selenoprotein P. Mnoge studije su pokazale da selen ima ulogu u sprječavanju nastanka karcinoma, kao i da suplementacija selenom smanjuje srčane aritmije, poboljšava srčanu funkciju, osnažuje imunost i reproduktivni sustav te regulira funkciju štitnjače sintezom aktivnog hormona (Mehdi i sur., 2013). Deficijencija, kao i pretjerana koncentracija selena u organizmu može imati štetno djelovanje na zdravlje. Serumske i plazmatske koncentracije selena od 20 do 40 ng mL<sup>-1</sup> se smatraju deficijencijom, te mogu dovesti do nastanka specifičnih bolesti, kao što su Keshanova bolest, Kashin-Beckova bolest i kretinizam. Pri koncentracijama selena većim od 250 ng mL<sup>-1</sup> može doći do gubitka kose i dermatitisa povezanih s pretjeranom količinom selena, dok koncentracije od 3200-7500 ng mL<sup>-1</sup> mogu dovesti do ozbiljnog otrovanja i smrti (Fairweather-Tait i sur., 2011). Selen ulazi u interakcije s brojnim elementima (Cd, Pb, As, Hg, Sb) u tijelu životinja i čovjeka. Može se direktno vezati na metalne ione ili se natjecati s njima za mjesto na receptorima. Antagonističko djelovanje povećava antioksidacijsku sposobnost organizma tako da povećava

aktivaciju glutation peroksidaze i može zaštititi vitalne organe - bubrege i jetru (Kieliszek i Błazejak, 2016).



Slika 2. Uloga selena u organizmu (preuzeto iz Kieliszek i sur., (2021);

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

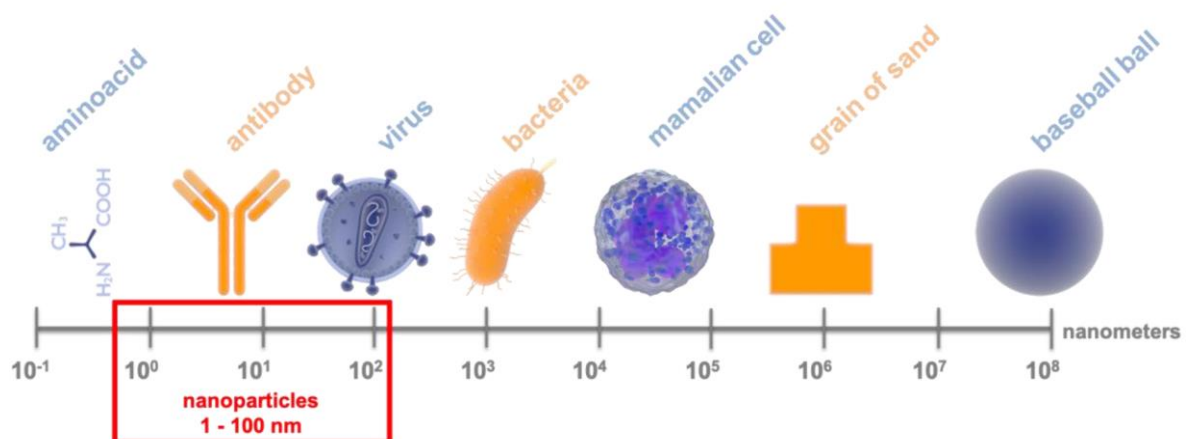
## 1.2. Nanočestice selena

Nanotehnologija se sve više koristi u različitim područjima kao što su farmacija, inženjerstvo, elektronika, energetika i kemija. Nanočestice su posebne po svojoj veličini, obliku, strukturi, površinskim te kemijskim svojstvima (Skalickova i sur., 2017). Materijali veličine 1-100 nm su područje interesa nanotehnologije. Zbog jedinstvenih svojstava kao što su sposobnost prodiranja kroz biološke barijere i visok omjer površine i volumena, nanočestice su moćan alat koji se koristi u medicini i industriji (Steckiewicz i Inkielewicz-Stepniak, 2020)



Nanočestice selena pokazuju slična fizička, kemijska i biološka svojstva kao druge nanočestice. Zbog male površine po jedinici volumena, nanočestice otpuštaju selen sporije i manja je mogućnost interakcija. Također, na njihovu se površinu može vezati veliki broj liganada kako bi se povećao afinitet prema ciljnom tkivu. Ključnim faktorima njihove aktivnosti se smatraju gustoća površinskog naboja i površinska hidrofobnost (Skalickova i sur., 2017). Kako se pokazalo, nanočestice elementarnog selena imaju veću djelotvornost od anorganskog selenita u reguliranju selenoproteina i manje su toksične. U usporedbi sa selenometioninom koji ima jako dobru bioraspodjeljivost i manju toksičnost od ostalih oblika selena, nanoselen je pokazao jednaku učinkovitost u regulaciji selenoproteina, ali smanjenu toksičnost. Zaključuje se da je nanoselen antioksidans sa smanjenim rizikom od pojave toksičnih posljedica selena (El-Ramady i sur., 2014). Kako je tehnologija napredovala, znanstvenici su imali potrebu pronalaziti nove metode i poboljšavati postojeće, tako da danas postoji veliki broj metoda koje se koriste u sintezi nanočestica, neke od kojih su: kemijska redukcija, hidrotermalna sinteza, sonokemijske metode, fototermalna sinteza, mikrovalna sinteza, biosinteza itd. (Skalickova i sur., 2017).

Biološke metode su metode izbora jer su cjenovno i ekološki prihvatljivije te manje toksične. Temelje se na upotrebi mikroorganizama i biljnih ekstrakata pri čemu se upotreba biljnih ekstrakata preferira jer eliminira proces uzgajanja i održavanja staničnih kultura (Alam i sur., 2019).



Slika 3. Usporedba veličine nanočestica s drugim objektima na logaritamskoj skali

(Steckiewicz i Inkielewicz-Stepniak, (2020);

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

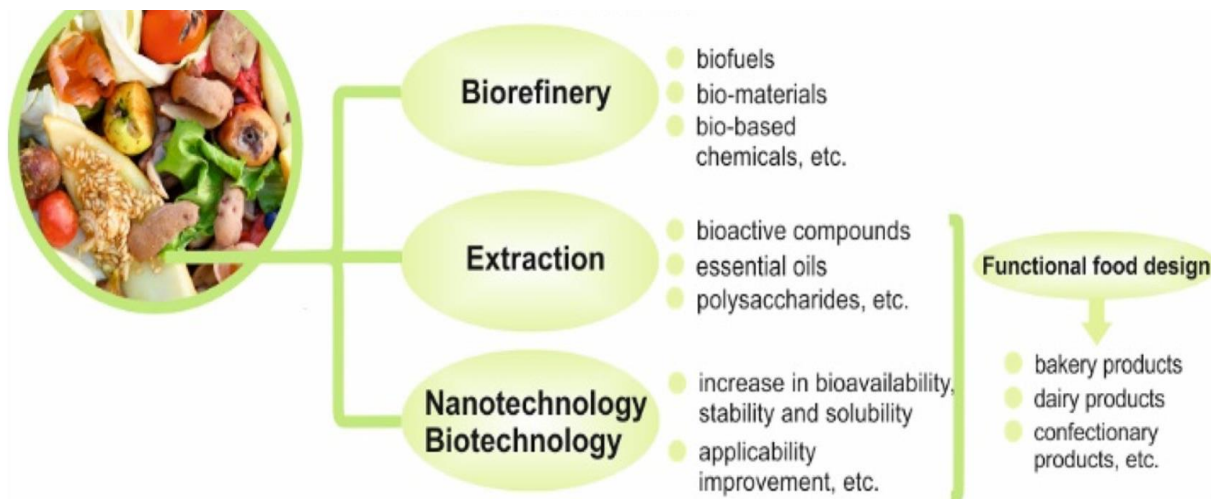
### **1.2.1. Primjena nanoselena u terapijske svrhe**

U odnosu na anorganske oblike, nanočestice selena pokazuju znatno smanjenu toksičnost, bolju biorasploživost i biološku aktivnost. Sve više se ispituje njihov potencijalni terapijski učinak u različitim procesima i stanjima u organizmu kao što su oksidativni stres, s upalom povezane bolesti poput artritisa, dijabetesa, raka i nefropatijama te posjeduju antimikrobnu aktivnost. Također, nanoselen može poslužiti kao nosač za ciljanu dostavu različitih vrsta lijekova. Nanočestice selena hvataju slobodne radikale, a to znatno bolje rade čestice male veličine (5-15 nm). Glavni nedostatak nanoselena je njegov slab transmembranski transport što se može prevladati oblaganjem čestica različitim ligandima. Ligandi tj. sredstva za oblaganje površine kontroliraju veličinu, stabilnost, selektivnost, staničnu apsorpciju, biorasploživost i biološku aktivnost što se pokazalo korisnim u terapiji raka (Khurana i sur., 2019).

### **1.3. Biootpad**

U biootpad između ostalog ubrajamo i otpad nastao procesuiranjem hrane koji se generira u kuhinjama, restoranima, poljoprivrednim površinama, prehrambenim pogonima itd., a doprinosi gotovo jednoj trećini ukupnog komunalnog otpada u svijetu. Biootpad je bogat proteinima, ugljikohidratima i lipidima te širokim spektrom bioaktivnih molekula (polifenola, prehrambenih vlakana, karotenoida) što ga čini izuzetno vrijednom sekundarnom sirovinom. Količina biootpada u svijetu raste iz dana u dan te prosječna globalna količina biootpada iznosi oko 1,3 milijardi tona u periodu od jedne godine. Tolika količina biootpada može imati mnoge negativne posljedice na okoliš, jer se njegovim odlaganjem generiraju toksični produkti koji kontaminiraju podzemne vode i uzrokuju emisiju štetnih plinova kao što su metan, vodik-sulfid i ostali. U tom kontekstu posebno je problematičan metan kao vrlo potentni staklenički plin. Spaljivanje biootpada također može negativno utjecati na zdravlje jer se time smanjuje kvaliteta zraka što doprinosi pojavi brojnih oboljenja. Zbog navedenih razloga, potrebna je adekvatna tehnologija za sigurno odlaganje i iskorištavanje biootpada. Mnogi znanstvenici predlažu anaerobnu digestiju kao najkorisniju tehniku za zbrinjavanje biootpada. Anaerobnom digestijom nastaje bioplin koji se sastoji od metana, ugljikovog dioksida i ostalih plinova, a iz njega se može dobiti

biometan koji se koristi kao gorivo. Digest koji nastaje može se koristiti kao gnojivo. Fizička i kemijska svojstva biootpada najviše ovise o njegovom izvoru i sastavu. Najvažnija fizička svojstva koja doprinose različitim procesima konverzije biootpada su količina vlage i nasipna gustoća, dok su najvažnija kemijska svojstva pH, električna vodljivost, približna analiza, sadržaj biopolimera i teških metala. Posljednjih godina, biootpad sve više privlači pažnju znanstvenika zbog svog kemijskog sastava, te se osim proizvodnje biogoriva i komposta razmatraju mogućnosti njegovog korištenja u druge svrhe. Iz biootpada se pomoću brojnih mikroorganizama koji ga koriste kao supstrat mogu dobiti organski polimeri kao što su polihidroksialkanoati (PHA) i polihidroksibutirati (PHB) koji se smatraju bioplastikom i potpuno su biorazgradivi na ugljikov dioksid i vodu u roku od nekoliko mjeseci od odlaganja. Biootpad koji je bogat organskim spojevima, može se koristiti za proizvodnju organskih kiselina kao što su mliječna, limunska, maslačna kiselina itd., smanjujući na taj način cijenu njihove proizvodnje. Različiti mikroorganizmi u različitim vrstama biootpada mogu proizvoditi različite enzime, pa tako npr. *Penicillium Sp.*, *Bacillus Sp.* i *Aspergillus Sp.* u komini jabuke i citrusa mogu proizvesti pektinazu. Enzimi dobiveni fermentacijom mogu se koristiti na mnoge načine u različitim industrijama. Mnoge studije su pokazale da biootpad sadrži i brojne funkcionalne spojeve koji imaju benefite za ljudsko zdravlje, kao što su bioaktivni peptidi, fenolni spojevi, karotenoidi i prehrambena vlakna. U budućnosti se očekuje pronalaženje novih metoda za zbrinjavanje biootpada koje će biti što je više moguće ekonomski i ekološki prihvatljive, a pomoću kojih će se potencijal biootpada maksimalno iskoristiti (Kannah i sur., 2020; Barik i sur., 2018).



Slika 4. Različite mogućnosti iskorištavanja biootpada (Capanoglu i sur., (2021);

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

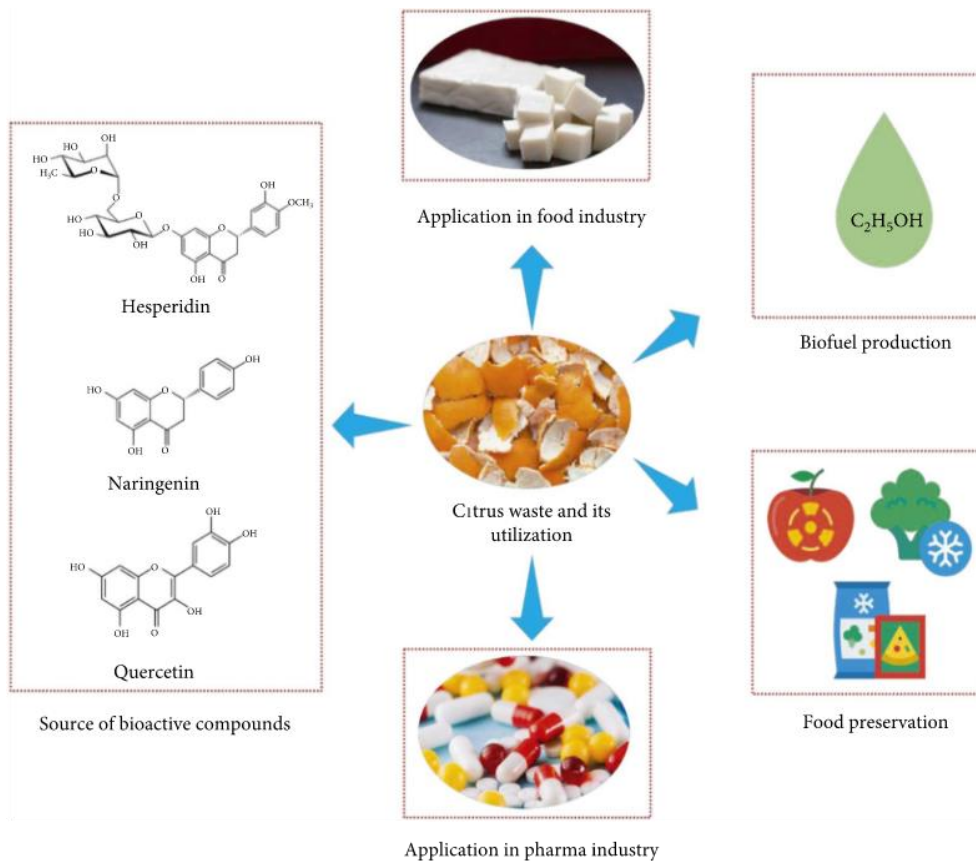
### 1.3.1. Komina mandarine

Citrusi među kojima su limun, grejpfrut, limeta, naranča i mandarina pripadaju voću koje se najviše kultivira na svijetu i čija proizvodnja raste iz godine u godinu s porastom potražnje potrošača. Prilikom njihove industrijske prerade u sokove, marmelade, eterična ulja itd. nastaje jako puno otpada kojeg čine kora, unutarinja opna, pulpa i koštice. Godinama se komina citrusa koristi za ekstrakciju pektina, prehranu domaćih životinja, proizvodnju komposta i goriva, ali se u zadnje vrijeme proučavaju alternativni, ekološki prihvatljiviji načini za iskorištavanje komine citrusa, kao što su proizvodnja pektinaze, bioetanola, biogoriva, nanočestica željeza i srebra, nanoceluloze itd.

Suha komina citrusa sadrži šećere, pektine, celulozu i hemicelulozu, ulja, vlakna, mikronutrijente te malu količinu vode. Također, citrusni otpad bogat je različitim aktivnim sastavnicama kao što su polifenoli (flavonoidi i fenolne kiseline), karotenoidi, vitamini, minerali i neki elementi u tragovima. Ovi bioaktivni spojevi imaju brojne terapijske učinke, a za citrusne polifenole je dokazano da imaju antioksidativni, antikancerogeni, antimikrobni, antiupalni i antiagregacijski učinak (Caballero i sur., 2021; Anticono i sur., 2020).

Kora mandarine (lat. *Citrus reticulata* Blanco, *Rutaceae*) ima visok ukupni sadržaj flavonoida u usporedbi s korom limuna i grejpa, a pokazalo se da posjeduje umjerenu

citotoksičnu aktivnost protiv stanične linije HL-60, eksperimentalnog modela akutne mijeloične leukemije. Također, kora mandarine, kao i limuna i grejpa, pokazala je imunomodulatorno djelovanje, jer povećava proliferaciju splenocita miša i antigenotoksični učinak smanjenjem kromosomskih mutacija uzrokovanih cisplatinom u istom eksperimentalnom modelu (Russo i sur., 2021).

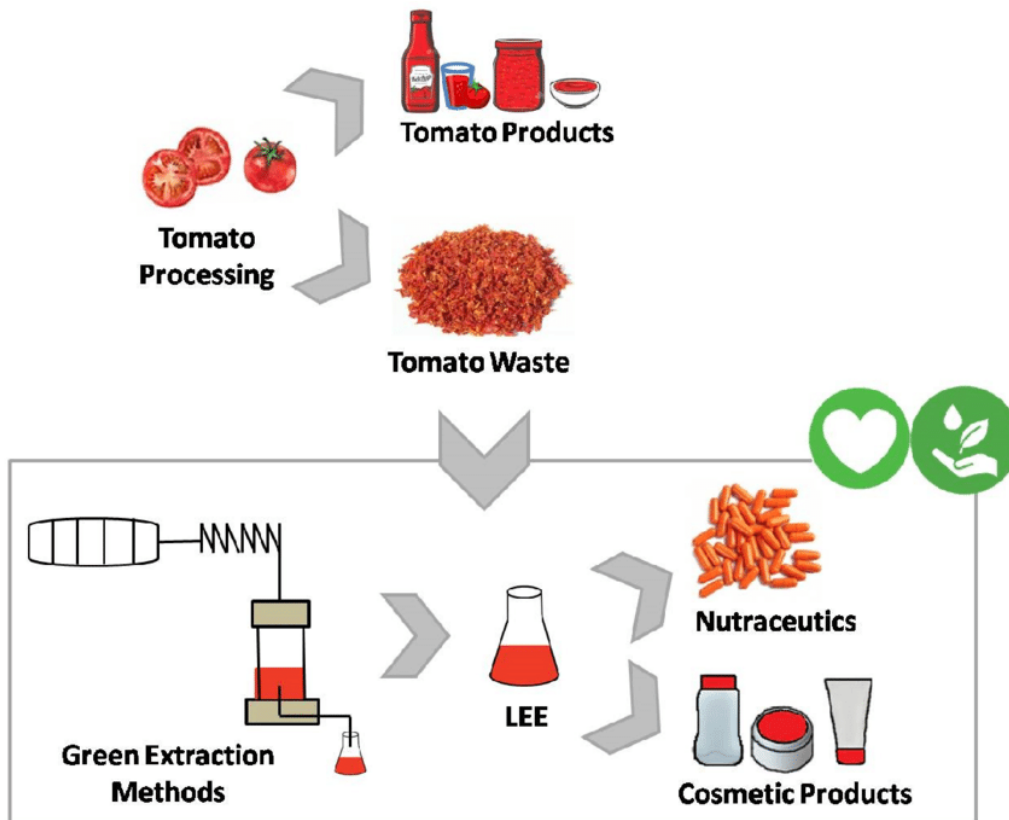


Slika 5. Upotreba otpada citrusa i važni bioaktivni spojevi (hesperidin, naringenin i kvercetin) (Khan i sur., (2021);

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

### 1.3.2. Komina rajčice

Rajčica (lat. *Solanum lycopersicum*, *Solanaceae*) se ubraja u skupinu najkultiviranijih biljaka na svijetu te se pri proizvodnji proizvoda od rajčice, kao što su pire, sok, umaci, suhi prah itd. generira velika količina otpada tj. komine koju je potrebno na odgovarajući način iskoristiti. Komina se sastoji od kože (40%) i sjemenki (60%). Komina rajčice, a posebno sjemenke, bogat su izvor proteina, masti i vlakana te se zbog toga koristi kao suplement u prehrani domaćih životinja i kao dodatak pekarskim proizvodima. Unatoč tome, zbog njene velike količine, javila se potreba za dodatnim iskorištavanjem. Novija istraživanja su pokazala da komina rajčice sadrži i bioaktivne komponente, kao što su fenolni spojevi (fenolne kiseline, flavonoidi), karotenoidi ( $\beta$ -karoten, likopen), nukleozidi (gvanidin, inozin, adenzin), polisaharidi (pektini), vitamini ( $\alpha$ -tokoferol) i ostali. Ove bioaktivne sastavnice posjeduju svojstva važna za ljudsko zdravlje pa tako fenolne komponente pokazuju antikancerogeno, antimikrobno, protuupalno i kardioprotektivno djelovanje, a karotenoidi posjeduju jak antioksidacijski potencijal što se povezuje sa smanjenim rizikom od raka, kardiovaskularnih bolesti itd. U budućnosti se planiraju daljnja istraživanja u svrhu maksimalnog iskorištavanja komine rajčice i njenih važnih sastavnica u medicini, farmaciji i kozmetologiji (Kumar i sur., 2021).

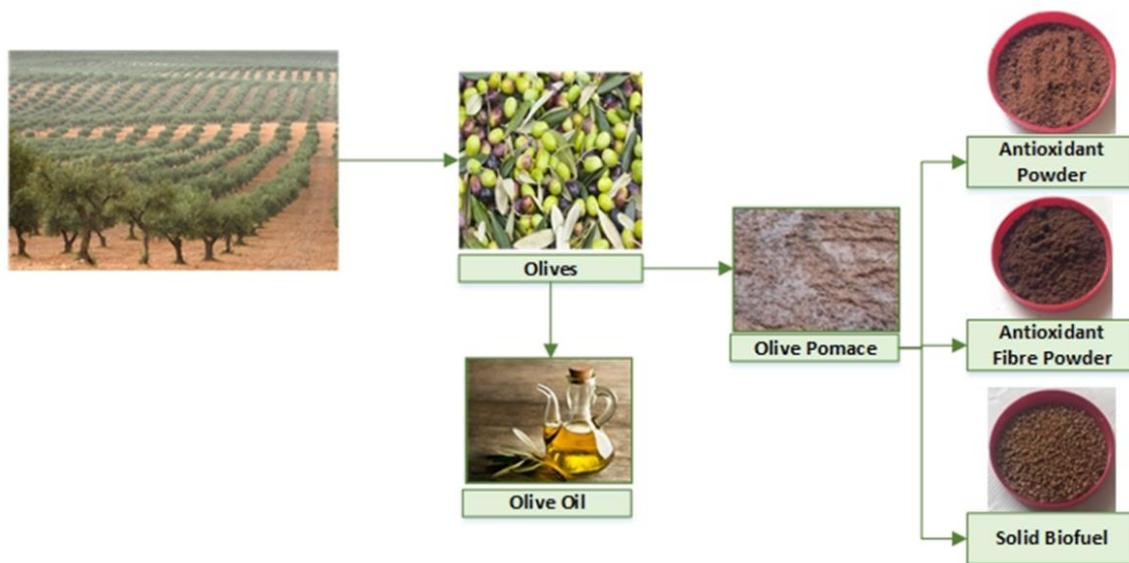


Slika 6. Proces prerade rajčice uz nastanak komine koja je značajan izvor likopena i ostalih bioaktivnih tvari (Costa i sur., (2021); <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

### 1.3.3. Komina masline

Proizvodnja maslinovog ulja iz plodova masline (lat. *Olea europaea*, *Oleaceae*) vodi ka nastanku nusproizvoda (komine masline i otpadnih voda) i otpada (listova masline i ostataka drveta) koji predstavljaju veliki problem za okoliš, prije svega u Mediteranskom području, zato što se generiraju velike količine u kratkom vremenskom periodu. Komina masline se sastoji od pulpe i koštica, a trenutno se prvenstveno koristi za dobivanje zaostalog ulja pomoću ekstrakcije otapalom. Dijelove koštica je također moguće koristiti kao goriva za grijane peći ili za proizvodnju aktivnog ugljena. Kako dehidriranje komine masline zahtijeva puno vremena i energije, znanstvenici zadnjih godina istražuju alternativne mogućnosti njenog iskorištavanja. Komina masline je heterogena smjesa različitih spojeva kao što su šećeri, metali i polifenoli koji se u komini nalaze u količini od 98g od 100g svih fenolnih spojeva u plodu masline te se zbog toga može smatrati sirovim materijalom velikog

potencijala. Fenolni spojevi imaju veliki antioksidacijski potencijal te u organizmu ostvaruju širok spektar bioloških učinaka. Polifenoli se također mogu koristiti u prehrambenoj industriji kao prirodni aditivi s antioksidativnim svojstvima kako bi produžili rok trajanja namirnica, smanjili gubitak nutritivne vrijednosti i proizvodnju štetnih tvari. To je posebno važno danas kada se najčešće koriste sintetski antioksidansi koji mogu imati i neke štetne učinke te je stoga razvoj i upotreba moćnih, ali netoksičnih antioksidansa prirodnog podrijetla trenutno područje opsežnog istraživanja (Difonzo i sur., 2021; Čepo i sur., 2018).



Slika 7. Postupak prerade ploda masline (Ribeiro i sur., (2020);

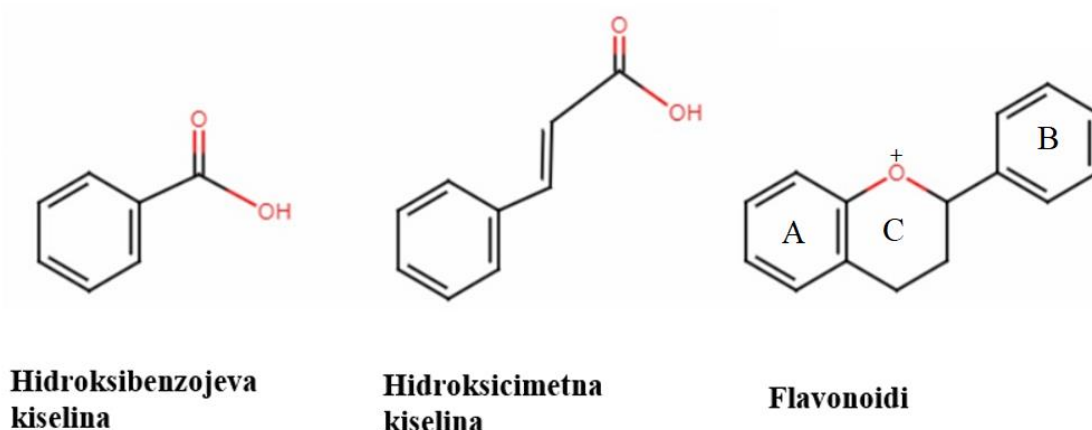
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

## 1.4. Fenolni spojevi

Biljna hrana je bogat izvor fenola, molekula koje mogu djelovati kao antioksidansi i protuupalne molekule te doprinjeti smanjenoj pojavnosti bolesti srca, smanjenju upale i učestalosti karcinoma i dijabetesa, kao i smanjenju stopa mutageneze u ljudskim stanicama. Ovi učinci koji su rezultat konzumacije biljnih proizvoda, kao što su voće, povrće i mahunarke, uglavnom su povezani s prisutnošću fenolnih spojeva. Fenolni spojevi sintetiziraju se u biljkama dijelom kao odgovor na ekološke i fiziološke pojave, kao što su napad patogena i insekata, UV zračenje, mehanička oštećenja itd. Osnovna strukturna značajka fenolnih spojeva je aromatski prsten koji nosi jednu ili više hidroksilnih skupina.



Skupina polifenola uključuje jednostavne fenole, kumarine, lignine, lignane, kondenzirane i hidrolizabilne tanine, fenolne kiseline i flavonoide. Flavonoidi su neki od najčešćih fenolnih spojeva, koji su široko rasprostranjeni u biljnim tkivima i često su uz karotenoide i klorofil odgovorni za njihovu plavu, ljubičastu, žutu, narančastu i crvenu boju (Khoddami i sur., 2013). Obitelj flavonoida uključuje nekoliko podgrupa: flavani, flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavanonoli i antocijani (Kurtagić, 2017). Svi flavonoidi su derivati aromatskih aminokiselina, fenilalanina i tirozina i imaju troprstenastu strukturu. Varijacije u strukturi flavonoida proizlaze iz hidroksilacije, prenilacije, alkalizacije i glikozilacije, reakcija koje mijenjaju osnovnu molekulu. Fenolne kiseline su druga glavna klasa fenolnih spojeva i javljaju se u obliku estera, glikozida ili amida, ali rijetko u slobodnom obliku. Varijacije u građi fenolnih kiselina očituju se u broju i položaju hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu. Fenolne kiseline imaju dvije osnovne strukture: hidroksicimetna i hidroksibenzojeva kiselina. U derivate hidroksicimetne kiseline ubrajaju se: ferulična, kafeinska, p-kumarinska i sinapinska kiselina, dok se u derivate hidroksibenzojeve kiseline ubrajaju: galna, vanilinska siringinska i protokatehinska kiselina. Druga velika klasa fenolnih spojeva su fenoli stanične stijenke. Oni su netopljivi, a pronađeni su u kompleksima s drugim vrstama staničnih komponenti. Dvije glavne skupine fenola stanične stijenke su lignini i hidroksicimetne kiseline. Ovi spojevi igraju ključnu ulogu u staničnoj stijenci tijekom rasta biljaka, štiteći ih od stresa kao što su infekcije, mehaničko oštećenje i UV zračenje. Tanine možemo podijeliti u dvije skupine, hidrolizabilne tanine i kondenzirane tanine. Oni imaju mogućnost stvaranja oksidativnih veza s drugim biljnim molekulama (Khoddami i sur., 2013).



Slika 8. Osnovne strukture fenolnih kiselina i flavonoida

## 1.5. Pektini

Pektini su sastavni dio složene smjese heteropolisaharida prisutne u staničnoj stijenci viših biljaka. Strukturno, okosnica pektina uključuje galakturonsku kiselinu na koju su vezani neutralni šećeri, što rezultira funkcionalnim područjima u kojima je esterifikacija ostataka ključna. Pektini utječu na mnoge fiziološke procese u biljkama, a i koriste se u brojnim granama industrije. Spojevi na bazi pektina također su obećavajući prirodni izvor bioaktivnih molekula korisnih za zdravlje. Svojstva pektina izazvala su interes za razvojem učinkovitih ekstrakcijskih postupaka ovih polisaharida iz prirodnih izvora korištenjem ekološki prihvatljivih protokola koji održavaju nativnu strukturu pektina. Povijesno gledano, pektini su se ekstrahirali iz povrća i voća tijekom obrade hrane. Nusproizvodi proizvodnje sokova, kao što su komina jabuke i kora citrusa, najkorisniji su izvori komercijalnih pektina. Također, otpad od rajčice, mrkve i bundeve korišten je za njihovu ekstrakciju. Zbog širokog spektra njihove primjene u različitim područjima, nove biljne vrste se sve više istražuju kao potencijalni izvori pektina. Pektini su se kroz povijest koristili kao aditivi u prehrambenoj industriji, poput sredstava za želiranje, emulgiranje i stabilizaciju i modulatora teksture. Imaju dobru biokompatibilnost i biorazgradljivost, nisu toksični i doprinose našim topljivim vlaknima u prehrani, jer se u gornjim crijevima čovjeka ne pojavljuju enzimski probavni pektini. Ipak, neka svojstva pektina snažno utječu broj i lokalizacija esterificiranih ostataka u homogalakturonskom području molekule. Svojstva pektina koriste se i u ne-prehrambenoj industriji, poput farmaceutske ili kozmetičke industrije. Kao emulgator ili sredstvo za zgušnjavanje, pektini su prisutni u kozmetičkim proizvodima, a također su korisni kao prijenosnici gena ili lijekova. Druge industrijske primjene sugeriraju da su polimeri koji sadrže pektin prikladni za pripremu biomaterijala za različite namjene (Millan-Linares i sur., 2021).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Najnovija znanstvena istraživanja ukazuju na poboljšana svojstva *per os* primjene selena u obliku nanočestica u odnosu na anorganski selenit koji vrlo često nalazimo u dodacima prehrani. Glavne prednosti nanoselena u odnosu na selenit su poboljšani farmakokinetički profil i veća terapijska širina.

Osnovni cilj ovog rada bio je razvoj zelene sinteze nanočestica selena primjenom funkcionalnih ekstrakata bogatih polifenolima i pektinima dobivenih iz otpada prehrambene industrije - komine masline, rajčice i mandarine. Konkretno, nizom eksperimenata istražena je njihova mogućnost funkcionalizacije i stabilizacije nastalih nanosustava.

Specifični ciljevi ovog rada bili su istražiti utjecaj navedenih ekstrakata na:

- tehnološke parametre nanoselena (raspodjelu veličine čestica i zeta potencijal)
- stabilnost nastalih nanosustava
- funkcionalizaciju nanoselena (postizanje direktne reduktivne i antiradikalne učinkovitosti)

Dobiveni rezultati doprinjet će razvoju učinkovitijih i sigurnijih sustava za oralnu primjenu nanoselena te naporima za povećanje iskorištavanja otpada prehrambene industrije s ciljem razvoja proizvoda dodane vrijednosti, poticanja kružne ekonomije i smanjenja ekološkog otiska procesa razvoja nutraceutika.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije i pribor

- Ultra-čista voda
- L-askorbinska kiselina (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev selenit (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Folin-Ciocalteu fenol reagens (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD)
- Natrijev karbonat bezvodni, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol - ABTS (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD)
- (±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina - Trolox (Sigma, Missouri, SAD)
- Filter za špricu (Chromafil xtra PES- 45/25 (0,45 $\mu$ m, 25mm))
- Erlenmeyerove tikvice
- Odmjerne tikvice
- Staklene čaše
- Žlice, stakleni štapići, špatule
- Lijevci
- Pipete
- Multikanalna pipeta RaininPipet-Lite XLS (Mettler Toledo, SAD)
- Falcon kivete 50ml
- Prozirna mikrotitarska ploča s 96 jažica i ravnim dnom (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Njemačka)
- Obične kivete
- Kivete za zeta potencijal (Malvern Instruments, Velika Britanija)

### **3.1.2. Radni instrumenti i oprema**

- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Vortex miješalica, VTX-3000L Mixer Uzusio (LMS, Tokio, Japan)
- Magnetska miješalica, MIX 15 eco (2mag AG, München, Njemačka)
- Centrifuga, Centric 322A (Domel, Železniki, Slovenija)
- Dijalizijska membrana D9527-100FT, MWCO 14 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Čitač mikrotitarskih ploča, Victor X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)
- pH-metar, 702 SM Titrino (Metrohm AG, Herisau, Švicarska)
- Zetaseizer Ultra (Malvern Instruments, Velika Britanija)

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

- Korištenje već gotovih suhих pektina dobivenih iz komine mandarine i rajčice te ekstrakta komine masline u zelenoj sintezi nanočestica selena
- Čišćenje uzoraka dijalizom
- Analiza veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala (DLS) nanočestica selena na uređaju Zetaseizer Ultra (Malvern Instruments, Velika Britanija)
- Određivanje antioksidacijskog potencijala (TEAC i F–C) nanočestica selena
- Praćenje stabilnosti uzoraka ponavljanjem svih mjerenja nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize i usporedbom dobivenih rezultata

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema suhog ekstrakta komine masline**

Pri provođenju eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišten je već gotov suhi ekstrakt komine masline koji je dobiven prethodno opisanim postupkom (Schauperl, 2020). Ukratko, osušena i prosijana komina masline bez koštica ekstrahirana je sa 60%-tnim etanolom (EtOH) na 70°C kroz 2h uz protresanje (100rpm). Etanol je uklonjen na rotavaporu, a ostatak je liofiliziran. Nastali suhi ekstrakt koristi se u zelenoj sintezi nanočestica selena.

### 3.2.2. Ekstrakcija pektina iz komina mandarine i rajčice

U provođenju eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišteni su suhi pektini ekstrahirani iz komine rajčice i mandarine koji su dobiveni prethodno opisanim postupkom (Jagodić, 2020). Ukratko, komine rajčice i mandarine ekstrahirane su sa 1% limunskom kiselinom na 85°C kroz 1,5h u Erlenmayerovoj tikvici, zatvorenoj alu-folijom uz konstantno protresivanje. Po završetku ekstrakcije smjesa se filtrirala kroz običan filter papir, a dobiveni filtrat dodan je u dvostruku količinu 96% etanola kako bi se pektini istaložili. Pektini su taloženi 1h na 4°C, a potom izdvojeni iz smjese vakuum filtracijom, te naknadnim centrifugiranjem u trajanju od 20min pri 39000rcf. Dobiveni pektini podijeljeni su na dva jednaka dijela. Jedan dio je bio nepročišćeni pektin, koji se odmah sušio, a drugi dio se dodatno ispirao 63% etanolom pomoću vakuum filtracije, kako bi se uklonile preostale topljive nečistoće i dobio pročišćeni, bijeli pektin koji se tek onda sušio. Osušeni sirovi i pročišćeni pektini su se potom koristili u zelenoj sintezi nanočestica selena.

### 3.2.3. Priprema otopina pektina i potrebnih kemikalija/reagenasa

#### •Priprema 0,05% otopina pektina:

Pripremi se 8 Erlenmeyerovih tikvica od 100ml u koje se odvaže po 15mg osušenih pektina redom: 1. pektini iz komine mandarine (uzorak M), 2. pročišćeni pektini iz komine mandarine (uzorak Mpr), 3. pektini iz komine mandarine (uzorak Mf), 4. pročišćeni pektini iz komine mandarine (uzorak Mprf), 5. pektini iz komine rajčice (uzorak R), 6. pročišćeni pektini iz komine rajčice (uzorak Rpr), 7. pektini iz komine rajčice (uzorak Rf), 8. pročišćeni pektini iz komine rajčice (uzorak Rprf) . U svaku tikvicu doda se potrebna količina ultračiste vode (po 28ml u tikvice označene sa M, Mpr, R, Rpr i po 23ml u tikvice označene sa Mf, Mprf, Rf i Rprf). Tikvice se stavljaju na magnetsku mješalicu na 1200 okretaja i ostavljaju preko noći. Sljedeći dan otopine se prebacuju u Falcon kivete od 50ml i centrifugiraju na 3500rpm 5 minuta, vorteksiraju, te ponovo centrifugiraju na 3500rpm 5 minuta. Supernatant se naglo izlije u tikvice tako da talog ostane u Falcon kivetu.

•Priprema 1% otopine ekstrakta komine masline:

Izvaže se 400mg gotovog, suhog ekstrakta komine masline u Falcon kivetu od 50ml, te doda 40ml ultračiste vode. Neposredno prije sinteze nanoSe, otopina se profiltrira kroz HPLC filter kako bi se uklonile veće čestice i moguće primjese.

•Priprema 0,1M otopine natrijevog selenita ( $Na_2SeO_3$ ):

345,8mg  $Na_2SeO_3$  otopi se u 20ml vode.

•Priprema 1M otopine L-askorbinske kiseline:

3,524g L-askorbinske kiseline otopi se u 20ml vode. Ovu otopinu potrebno je pripremiti svježu prije početka analize.

Sastav i količine kemikalija i ekstrakata potrebnih za izradu uzoraka prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav i količine potrebnih sastojaka za pripremu uzoraka M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf

	$Na_2SeO_3$ (0.1M)/mL	L-ask (1M)/mL	EKM (1 %)/mL	pektin/ mg	voda/ mL	ukupna V/ mL	% EKM	% pektina
M	1	1	0	15	28	30	0	0,05%
R	1	1	0	15	28	30	0	0,05%
Mpr	1	1	0	15	28	30	0	0,05%
Rpr	1	1	0	15	28	30	0	0,05%
Mf	1	1	5	15	23	30	0,17	0,05%
Rf	1	1	5	15	23	30	0,17	0,05%
Mprf	1	1	5	15	23	30	0,17	0,05%
Rprf	1	1	5	15	23	30	0,17	0,05%

### 3.2.4. Sinteza nanočestica selena

U otopine pektina doda se L-askorbinska kiselina i ekstrakt komine masline (samo u tikvice označene sa Mf, Rf, Mprf i Rprf) te kap po kap otopine  $Na_2SeO_3$  prema Tablici 1. Tijekom dodavanja  $Na_2SeO_3$  otopine postepeno mijenjaju boju u crvenu. Nastale otopine se miješaju na magnetskoj miješalici još 20 minuta nakon čega se prebacuju u dijalizijske

membrane. Dijalizijske membrane su prethodno namočene u vodi preko noći i voda je promijenjena 3 puta. MWCO (eng. Molecular Weight Cut Off) dijalizijskih membrana je 14000 što znači da zadržavaju sve čestice i nečistoće veće od 14000kDa. Jedna strana membrane se zarola i zakači štipaljkom, pažljivo se ulije otopina pripremljenog uzorka (30ml), te drugi kraj membrane ponovo zarola i zatvori štipaljkom. Postupak se ponovi za preostalih 7 uzoraka. Otopine u dijalizijskim membranama se uranjaju u čaše od 1000ml sa oko 900ml vode. Dijalizijske membrane je potrebno zakačiti nosačem za rub čaše kako bi bile jednako udaljene od stijenki čaše i potpuno uronjene u vodu. Dijaliza se provodi preko noći na magnetskoj mješalici, kao što je prikazano na Slici 9. Vodu je potrebno promijeniti 3 puta - prvi put nakon 30min do 3h, drugi put nakon 4-5h i treći put nakon protekle noći.



Slika 9. Dijaliza otopina nanoselena na magnetskoj miješalici (Fotografija snimljena tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)



Nakon dijalize, otopine nanoselena se prebace u staklene bočice sa čepom i označe jednako kao i tikvice u kojima su pripremljeni uzorci (M, Mpr, Mf, Mprf, R, Rpr, Rf i Rprf), kao što je prikazano na Slici 10. Uzorci su spremni za analize.



Slika 10. Uzorci nanoselena spremni za analize (Fotografija snimljena tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

### 3.2.5. Određivanje veličine čestica i koncentracije

Jedno od najvažnijih fizičkih svojstava pojedinog uzorka je veličina čestica. U mnogim slučajevima, uz mjerenje veličine čestica, provodi se i mjerenje koncentracije uzorka koja je također bitno svojstvo za predviđanje ponašanja tvari, a pogotovo nanomaterijala.

Uređaj korišten za mjerenje veličine nanočestica selena i koncentracije je Zetaseizer Ultra (Malvern Instruments, Velika Britanija) (Slika 12) sa zelenim laserom valne duljine 532nm, a tehnika koja je korištena je dinamičko raspršenje svjetlosti (eng. Dynamic Light Scattering - DLS). DLS je neinvazivna, točna tehnika za mjerenje veličine, raspodjele veličine molekula i čestica dispergiranih ili otopljenih u tekućini i koncentracije čestica u uzorku. Ovom tehnikom

moguće je izmjeriti čestice čak i manje od 1nm pa sve do nekoliko mikrometara. Temelj ove metode je Brownovo gibanje čestica ili molekula u suspenziji. Brownovo gibanje je nasumično gibanje čestica koje potječe od sudara čestica sa molekulama otapala. Manje čestice se gibaju brže, a veće sporije te to uzrokuje raspršivanje laserske svjetlosti različitog intenziteta. Analizom ovih fluktuacija intenziteta dobiva se brzina Brownovog gibanja, a time i veličina čestica uz pomoću Stokes-Einsteinove jednadžbe (Hallett, 1994).

Prilikom mjerenja veličine nanočestica selena, u kivetu je otpipetiran po 1 ml svakog uzorka. Mjerenje veličine čestica je za svaki uzorak provedeno 3 puta, te ponovljeno nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize kako bi se pratila stabilnost uzoraka. Uzorci Mf, Rf, Mprf i Rprf su razrijeđeni 40x prije svakog mjerenja, uzorci R i Rpr su razrijeđeni 40x 2., 5., 9., 20. i 30. dana mjerenja, a uzorci M i Mpr 40x 5., 9., 20. i 30. dana mjerenja jer je došlo do zamucenja uzoraka stajanjem te je, da bi se ostvarili isti uvjeti pri svakom mjerenju bilo potrebno razrijediti uzorke. Temperatura pri kojoj se provodilo mjerenje bila je 25°C, a intenzitet raspršene svjetlosti je mjeren pri kutu od 174,7°. Rezultati su dobiveni pomoću Zetaseizer računalnog programa i interpretirani su kao raspodjela veličine čestica po intenzitetu.

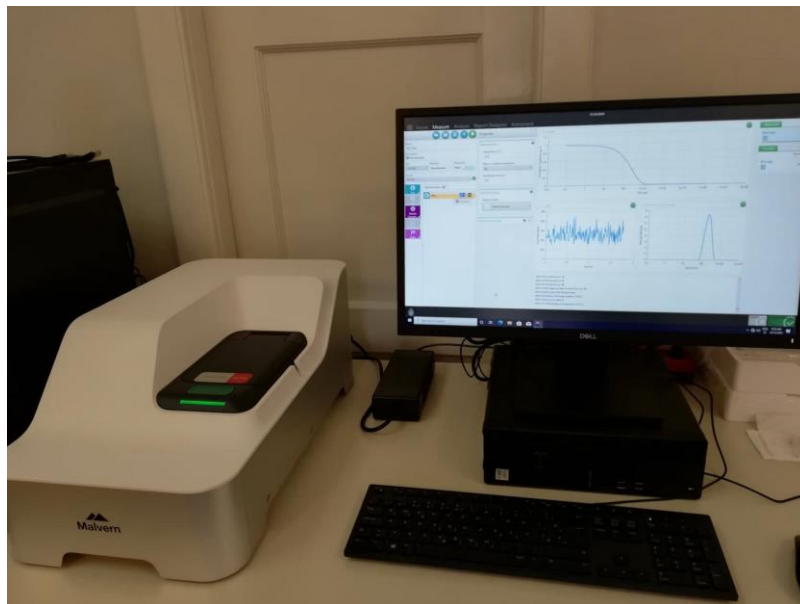
### **3.2.6. Mjerenje zeta potencijala**

Jezgru koloidne čestice u disperziji okružuje sloj koji se sastoji od dva dijela: sloj slabo pokretnih iona (unutrašnji, Sternov sloj) te sloj pokretnih iona suprotnog naboja iz otapala (vanjski, difuzijski sloj). Nabijene dispergirane čestice putuju u električnom polju prema suprotno nabijenoj elektrodi (elektroforetska pokretljivost). Skupa s česticom giba se i Sternov sloj i dio vezanih molekula otapala, odijeljen od ostalih molekula otapala plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti plohe smicanja je elektrokinetički zeta potencijal ( $\zeta$ ). Zeta potencijal jedan je od najvažnijih parametara koloidnih sustava koji utječu na stabilnost. Njegovo mjerenje donosi detaljan uvid u uzroke disperzije, agregacije i flokulacije i može se koristiti kako bi se poboljšala formulacija disperzija, emulzija i suspenzija. Mjerenje zeta potencijala se koristi u širokom spektru industrija uključujući farmaciju i medicinu, kao tehnologija koja reducira vrijeme i cijenu za ispitivanje stabilnosti formulacije (Salopek i sur., 1992). Za mjerenje zeta potencijala također se koristio uređaj Zetaseizer Ultra (Malvern Instruments, Velika Britanija) uz posebne jednokratne kivete kako bi se gotovo u potpunosti eliminirala mogućnost kontaminacije uzorka. Kivete se sastoje od spremnika od polikarbonata sa zatvaračima i

bakrenim elektrodama obloženim zlatom. Iako su jednokratne, mjerenje se na jednom uzorku može provesti i više stotina puta. Kao i za mjerenje veličine čestica i koncentracije, za mjerenje zeta potencijala se koristi DLS tehnologija. Mjerenje svakog uzorka se ponavljalo 3 puta pri temperaturi od 25°C, a uzorci su bili nerazrijeđeni.



Slika 11. Kiveta DTS1070 za mjerenje zeta potencijala napunjena uzorkom (Fotografija snimljena tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)



Slika 12. Uređaj Zetaseizer Ultra korišten za mjerenje veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala (Fotografija snimljena tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

### 3.2.7. Određivanje antioksidacijskog potencijala uzoraka TEAC metodom

TEAC (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) je metoda kojom se mjeri antioksidacijski potencijal određene supstancije usporedbom sa standardom, Troloxom, vodotopljivim analogom vitamina E tj.  $\alpha$ -tokoferola. Koristi se otopina ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) radikal kationa ( $ABTS^{\cdot+}$ ) koja nastaje miješanjem otopine ABTS-a i kalijevog persulfata kao oksidansa. Mjeri se gašenje apsorbancije  $ABTS^{\cdot+}$  u prisutnosti antioksidansa pri 734nm na čitaču mikrotitarskih ploča, Victor X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD). Gašenje apsorbancije je veće, što je veći antioksidacijski potencijal. Reakcijom sa potencijalnim antioksidansima iz uzorka, plavo-zelena otopina  $ABTS^{\cdot+}$  se obezboji tj. neutralizira se. Ova metoda ima prednost u odnosu na druge metode za mjerenje antioksidacijskog potencijala (DPPH i DMPD) zbog topljivosti ABTS radikal kationa i u vodi i u organskim otapalima, te se može koristiti za mjerenje antioksidacijskog potencijala i hidrofilnih i lipofilnih ekstrakata. Osim toga na ABTS radikal kation ne utječe ionska snaga spojeva pa se može koristiti u širokom rasponu pH vrijednosti (Re i sur., 1999; Miller i sur., 1993).

Priprema otopina:

• 7mM otopina ABTS radikala: tableta od 10mg ABTS-a otopi se u 2,6ml pročišćene vode.

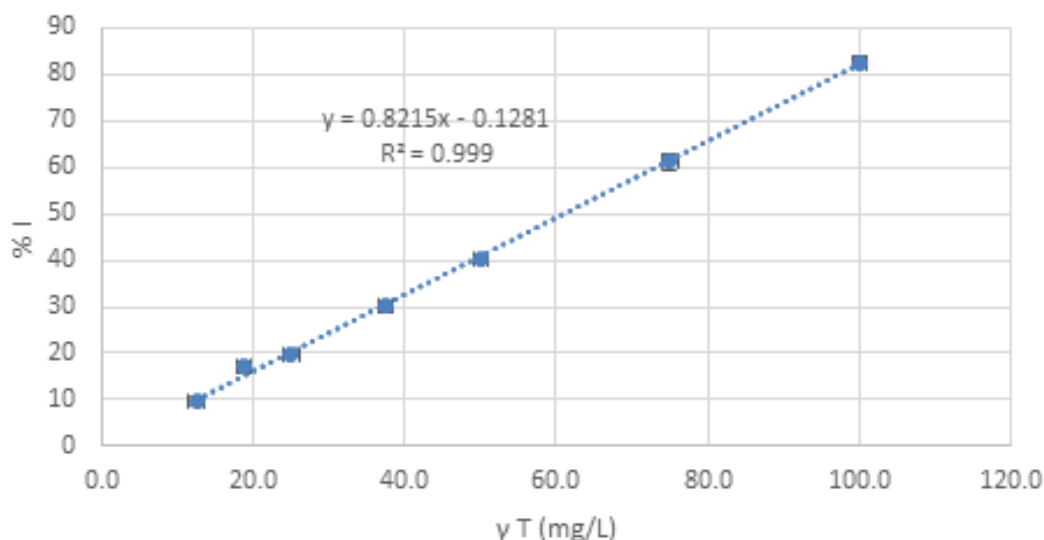
• 1,63mM otopina kalijevog persulfata ( $K_2S_2O_8$ ): 6,62mg  $K_2S_2O_8$  otopi se u 5ml pročišćene vode i nadopuni do 100ml.

Jednak volumen otopine kalijevog persulfata (2,604ml) doda se otopini ABTS radikala. Nastala otopina čuva se u mraku pri sobnoj temperaturi 12-16h dok se reakcija nastanka ABTS radikal kationa ne završi. Nakon 12-16h mjeri se apsorbancija otopine pri 734nm. Ako apsorbancija prelazi vrijednost  $0,7 \pm 0,02$ , otopinu je potrebno razrijediti.

Otopina je razrijeđena 25x.

• 1g/L otopina Trolox-a: 5mg Trolox<sup>®</sup>-a otopi se u 96% etanolu u odmjerne tikvici od 5ml te nadopuni do oznake.

Baždarni dijagram (Slika 13) izradi se mjerenjem apsorbancije otopina poznatih koncentracija Trolox<sup>®</sup>-a u rasponu 3-100 mg/L pripremljenih razrjeđivanjem ranije priređene otopine Trolox-a etanolom.



Slika 13. Baždarni dijagram ovisnosti postotka inhibicije (%I) tj. gašenja apsorbancije o koncentraciji Trolox-a ( $\gamma T$ )

Provođenje metode:

20  $\mu$ L nerazrijeđenog uzorka i 20  $\mu$ L destilirane vode otpipetira se u jažicu mikrotitarske ploče te se doda 200  $\mu$ L razrijeđene otopine ABTS radikal kationa. Kontrolni uzorak pripremi se pipetiranjem 20  $\mu$ L pročišćene vode i 200  $\mu$ L razrijeđene otopine ABTS radikal kationa. Mikrotitarska ploča se najprije postavi na lagano protresivanje kroz 60s u čitaču mikrotitarskih ploča, a nakon toga se inkubira na 30°C kroz 90s. Po završetku inkubacije, izmjeri se i očita apsorbancija uzorka pri 734nm.

Mjerenje se za svaki uzorak provodi u kvadrilikatu kao što je prikazano u Tablici 2.

Dobiveni rezultati izražavaju se kao postotak inhibicije (%I) ABTS radikala prema jednadžbi:

$$\%I = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

gdje je  $A_0$  apsorbancija razrijeđene otopine ABTS kation radikala, a  $A_1$  apsorbancija uzorka.

Pomoću baždarnog dijagrama Trolox-a, vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzorka izražavaju se kao ekvivalenti Trolox-a<sup>®</sup> (Re i sur., 1999).

### 3.2.8. Određivanje ukupnog antioksidacijskog potencijala uzoraka Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu (FC) je standardizirana metoda koja se koristi u rutinskoj kontroli kvalitete i mjerenju antioksidativnog kapaciteta prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani. Metoda se temelji na reakciji fenolnih spojeva iz uzorka s kolorimetrijskim reagensom (FC) što omogućuje mjerenje u vidljivom dijelu spektra. Reakcija predstavlja prijenos elektrona u alkalnom mediju s fenolnog spoja na fosfomolibdat i fosfovolframat u strukturi FC reagensa. Reagens se priprema miješanjem natrijevog volframata i fosfomolibdinske kiseline u fosfornoj kiselini. Ono što je potrebno uzeti u obzir pri tumačenju FC testa je to da je reakcija nespecifična i da drugi oksidacijski supstrati u uzorku mogu interferirati na inhibicijski, aditivni ili pojačavajući način. Do inhibicije može doći kao rezultat natjecanja oksidansa s FC reagensom ili oksidacije zraka nakon što je uzorak zalužen. Zbog toga se FC reagens dodaje prije lužine. Učinci aditiva nastaju zbog neočekivanih fenola, aromatskih amina, visoke razine šećera ili askorbinske kiseline u ekstraktu. Zbog nespecifične prirode FC metode, rezultat je mjera ukupnih fenola i drugih oksidacijskih supstrata. Međutim, FC metoda je jednostavna i brza, te se naširoko koristi kao dijagnostički alat za antioksidativni kapacitet ekstrakata biljaka (Ainsworth i Gillespie, 2007).

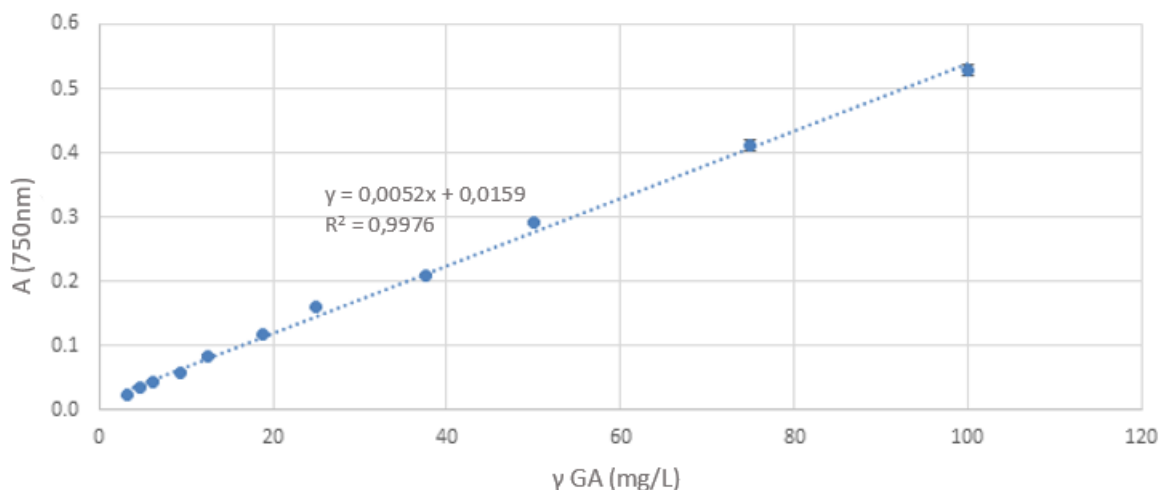
FC reagens je žute boje, a dodatkom uzorka koji sadrži reducirajuće spojeve mijenja boju u plavo. Njihov sadržaj u uzorku proporcionalan je vrijednostima apsorbancije koja se mjeri pri 750-765nm.

Priprema otopina:

•10% otopina FC reagensa: 500µl FC reagensa pomiješa se sa 4500µl pročišćene vode

•700 mM otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: otopiti 3,71g bezvodnog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u pročišćenoj vodi, zagrijati na 40°C ako je potrebno te prenijeti u tikvicu od 50ml i nadopuniti vodom do oznake.

Izradi se baždarni dijagram galne kiseline (Slika 14) tako da se pripreme razrijeđene otopine galne kiseline od 3g/l – 100g/l, te izmjere apsorbancije.



Slika 14. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije mjerene pri 750nm (A) o koncentraciji galne kiseline ( $\gamma$ GA)

Otopine uzoraka pripreme se pipetiranjem 20 $\mu$ l uzorka i 50 $\mu$ l otopine FC reagensa. To se inkubira 5 minuta na 37°C u čitaču mikrotitarskih ploča, a potom doda 160 $\mu$ l otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i inkubira još 30 minuta. Očita se apsorbancija pri 750 nm, a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline pomoću baždarnog dijagrama. Svaki uzorak mjeri se u kvadriplikatu, kao što je prikazano u Tablici 2 (Ainsworth i Gillespie, 2007).

Tablica 2. Shema pripreme mikrotitarske ploče za mjerenje antioksidacijskog potencijala pomoću TEAC i FC metode (B-blank tj. kontrolni uzorak)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		M	M	M	M	R	R	R	R			
C		Mpr	Mpr	Mpr	Mpr	Rpr	Rpr	Rpr	Rpr			
D		Mf	Mf	Mf	Mf	Rf	Rf	Rf	Rf			
E		Mprf	Mprf	Mprf	Mprf	Rprf	Rprf	Rprf	Rprf			
F		B	B	B	B							
G												
H												

### 3.2.9. Statistička obrada podataka

Sve su analize provedene u kvadriplikatu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Za usporedbu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance uz provođenje Bonferonijevog post hoc testa. Statistički značajna razlika definirana je za vrijednost  $p \leq 0,05$ . Za provođenje statističke analize rezultata korišten je programski paket GraphPad Prism 8,0 (GraphPad Software LLC).

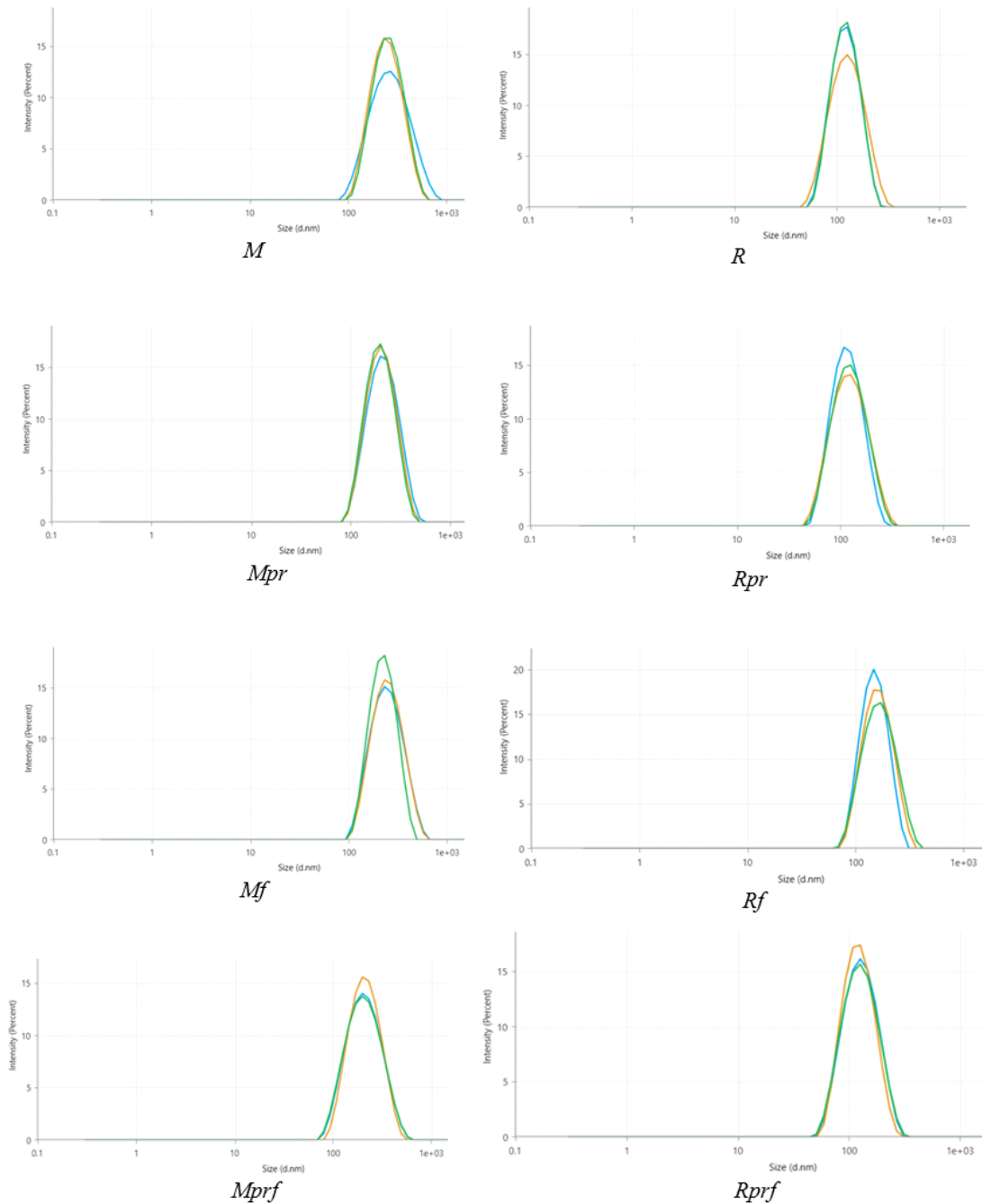
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Određivanje raspodjele veličine čestica

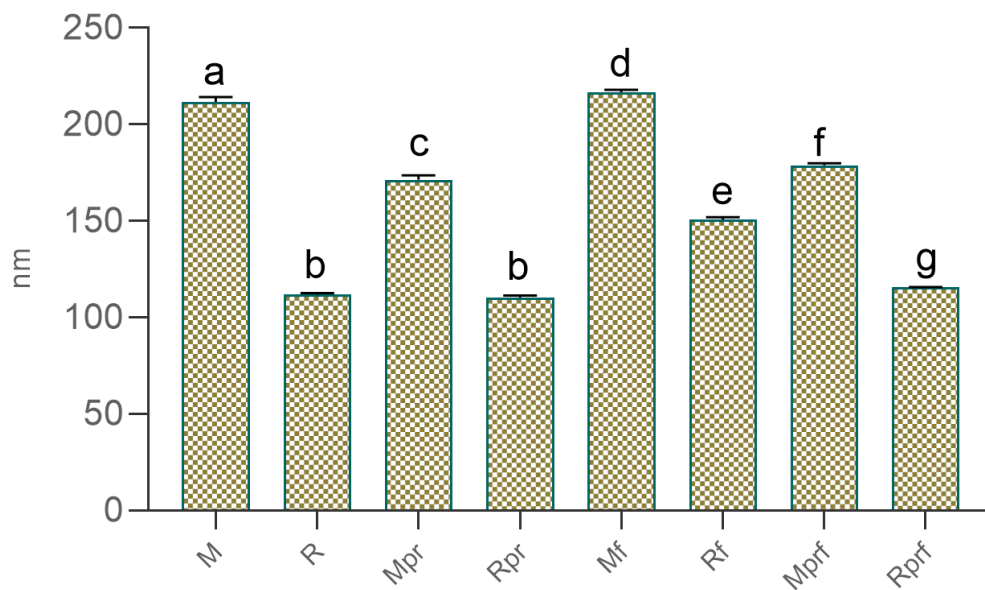
Vrijednosti veličina nanočestica selena u uzorcima, izmjerene pomoću uređaja Zetaseizer Ultra (Malvern Instruments, Velika Britanija) metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) izražene su grafički kao raspodjela veličine čestica po intenzitetu raspršene svjetlosti za svaki uzorak što je prikazano na Slici 15. Mjerenje se za svaki uzorak provodilo u triplikatu, a grafički prikaz srednjih vrijednosti dobivenih veličina nanočestica selena u uzorcima prikazan je na Slici 16. Rezultati pokazuju da su u uzorcima prisutne čestice u rasponu vrijednosti od 110 do 220 nm. Iz dobivenih podataka može se vidjeti da su u uzorcima s pektinima iz komine mandarine prisutne veće čestice nego u uzorcima s pektinima iz komine rajčice. U uzorcima koji sadrže pročišćeni pektin kako komine mandarine tako i komine rajčice, nanočestice selena su nešto manjih veličina od uzoraka u kojima je korišten sirovi pektin što upućuje na to da je upotreba pročišćenog pektina adekvatnija jer nanočestice manjih veličina pokazuju bolje biološke učinke. Na Slici 17 prikazana je promjena srednjih vrijednosti veličina nanočestica selena u uzorcima nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize. Iz podataka prikazanih na Slici 17 može se primijetiti da je u uzorcima s pektinima iz komine rajčice došlo do skoro zanemarivih promjena vrijednosti veličine čestica u odnosu na prvi dan mjerenja te bi se moglo zaključiti da su uzorci stabilniji u odnosu na uzorke s pektinima iz komine mandarine u kojima je došlo do većih oscilacija u rezultatima u odnosu na prvo mjerenje. Prema rezultatima prikupljenim tijekom zadnjih godina, nanočestice raspona veličina od 1 do 100 nm omogućavaju dostavu veće koncentracije bioaktivnih



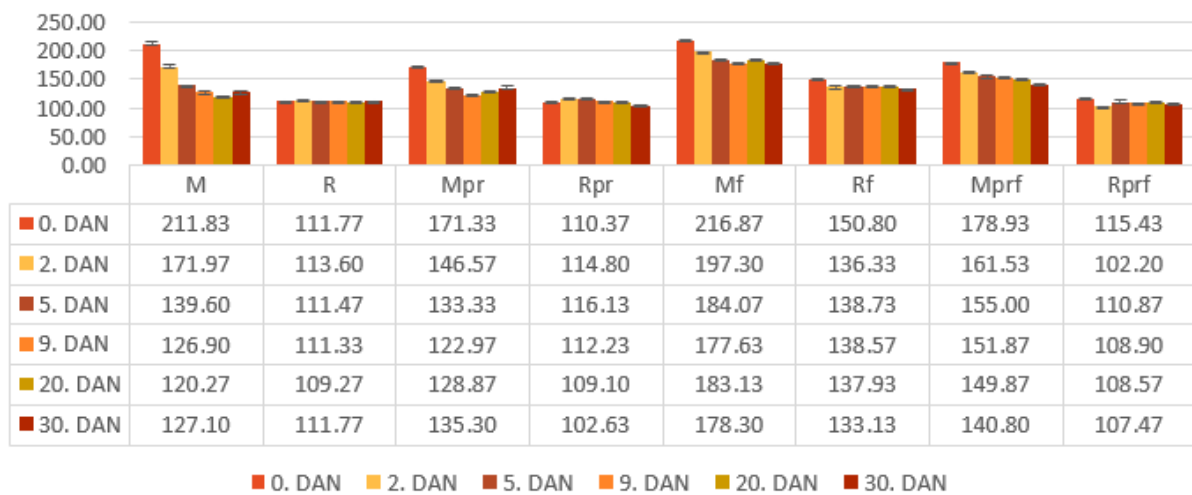
spojeva u stanice i tkiva i njihovo duže zadržavanje u organizmu (smanjivanjem metabolizma i izlučivanja bioaktivnih spojeva) kroz usporavanje isporuke na ciljno mjesto (Martínez-Ballesta i sur., 2018). U literaturi su pronađeni podaci kako veća koncentracija biljnih ekstrakata vodi ka stvaranju manjih i stabilnijih nanočestica zbog postojanja veće količine sredstava za njihovo oblaganje, a u suprotnom može doći do aglomeracije koja dovodi do stvaranja agregata i nepoželjna je u proizvodnji nanočestica (Basnet i sur., 2018). Naime, u literaturi je pronađeno i istraživanje u kojem je pokazano kako povećanje količine biljnog ekstrakta dovodi do povećanja veličine nanočestica. U navedenom istraživanju su sintetizirane nanočestice srebra metodom zelene sinteze korištenjem ekstrakta biljke *Acacia cyanophylla*. Nanočestice s omjerom srebrovog nitrata i biljnog ekstrakta 9:1 bile su najmanje (86,98 nm), dok su one s omjerom srebrovog nitrata i biljnog ekstrakta 5:5 bile najveće (347,2 nm) (Jalab i sur., 2021). Dobivene vrijednosti veličina nanočestica u uzorcima koji sadrže EKM (Mf, Rf, Mprf i Rprf) veće su od vrijednosti veličina nanočestica u istim uzorcima bez EKM (M, R, Mpr i Rpr), što je u skladu sa zaključkom navedenog istraživanja da veća količina biljnog ekstrakta doprinosi povećanju veličine nanočestica. Može zaključiti se da veličina čestica ne ovisi samo o količini sredstava za oblaganje već i o sastavu smjese tj. o vrsti korištenog sredstva za oblaganje.



Slika 15. Raspodjela veličine čestica po intenzitetu raspršene svjetlosti za uzorke M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf



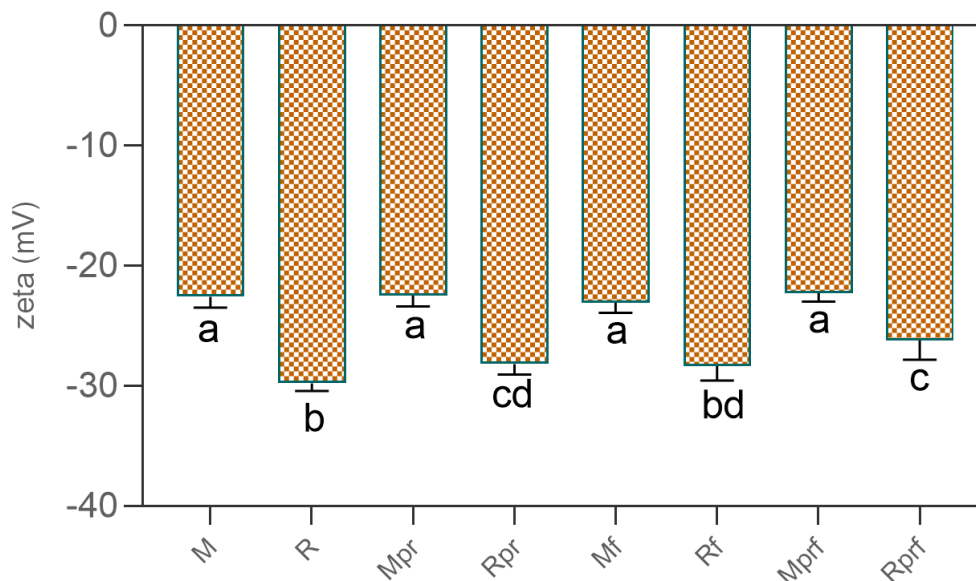
Slika 16. Grafički prikaz prosječne veličine nanočestica selena (nm) u uzorcima M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf  
*Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0,05$ )*



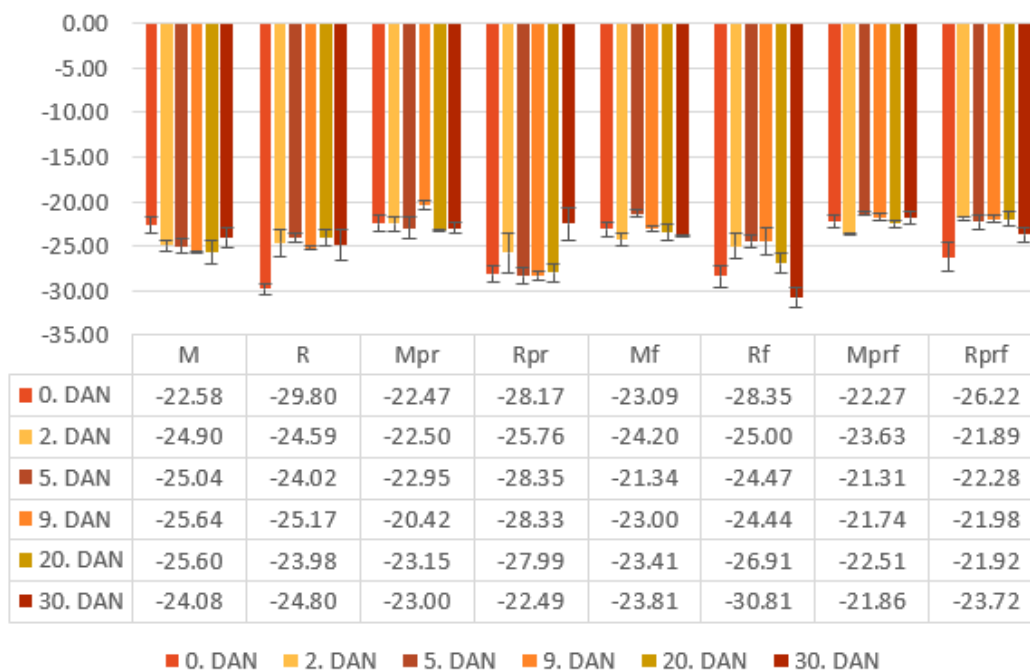
Slika 17. Promjena prosječne veličine nanočestica selena (nm) u uzorcima nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize radi procjene stabilnosti uzorka

## 4.2. Određivanje zeta potencijala

Vrijednosti zeta potencijala označavaju stupanj odbijanja između nabijenih čestica u disperziji. Visoke vrijednosti zeta potencijala (bilo negativne ili pozitivne) ukazuju na postojanje visoko nabijenih čestica u disperziji što sprječava agregaciju čestica usljed električnog odbijanja. Ako je zeta potencijal nizak, privlačnost prevladava odbijanje te je vjerojatno da u disperziji dolazi do stvaranja koagulata. Vrijednosti zeta potencijala između  $\pm 20$  i  $\pm 40$  mV osiguravaju stabilnost sustava i manju sklonost ka agregaciji te povećanju veličine čestica (Samimi i sur., 2019). Dobivene vrijednosti zeta potencijala uzoraka nalaze se između  $-29,80$  mV i  $-22,27$  mV što znači da su disperzije relativno stabilne. Rezultati su u skladu sa vrijednostima zeta potencijala dobivenim u drugima istraživanjima gdje su se koristili biljni ekstrakti u zelenoj sintezi nanočestica selena npr. Alghuthaymi i sur., (2021) su koristili ekstrakt kore cimeta (*Cinnamomum Zeylanicum*) u zelenoj sintezi nanoselena, a vrijednost zeta potencijala je iznosila  $-28,6$  mV; Mellinas i sur., (2019) su koristili ekstrakt zrna kakaa (*Theobroma cacao*) u zelenoj sintezi nanočestica selena i dobili vrijednost zeta potencijala od  $-28,6 \pm 5,3$  mV. Može se primijetiti da nanočestice selena u uzorcima sa pektinima iz komete rajčice imaju zeta potencijal nešto negativniji od istih u uzorcima sa pektinima iz komete mandarine što ih čini stabilnijima, a to je potvrđeno analizom rezultata dobivenih mjerenjem zeta potencijala nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize (Slika 19) što kometu rajčice čini pogodnijom za izolaciju pektina i njihovo korištenje kao stabilizatore nanočestica. Uzorci s dodatkom EKM ne pokazuju različite vrijednosti zeta potencijala od ostalih uzoraka, što upućuje na to da EKM ne doprinosi povećanju stabilnosti uzoraka nanočestica.



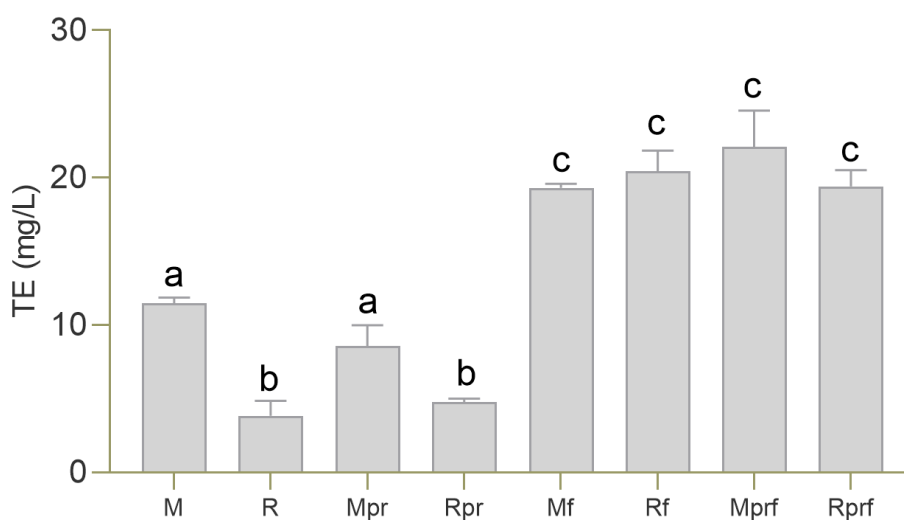
Slika 18. Srednje vrijednosti zeta potencijala uzoraka M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf  
 Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0,05$ )



Slika 19. Promjena prosječnog zeta potencijala uzoraka nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka  
 analize radi procjene stabilnosti uzoraka

### 4.3. Određivanje antioksidacijskog potencijala uzoraka TEAC metodom

Cilj provođenja ove metode bio je izmjeriti antioksidacijski potencijal uzoraka te zaključiti doprinosi li dodatak EKM njegovom povećanju. Vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzoraka dobiju se tako da se prvo izračuna postotak inhibicije (% I) ABTS radikala prema ranije navedenoj jednadžbi, a potom se pomoću baždarnog dijagrama Trolox-a (Slika 13) rezultati izražavaju se kao ekvivalenti Trolox-a<sup>®</sup>. Uzorci sa dodatkom EKM (Mf, Rf, Mprf i Rprf) pokazali su značajno veći antioksidacijski potencijal u odnosu na uzorke samo sa pektinima. Vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzoraka s EKM izražene kao ekvivalenti Trolox-a<sup>®</sup> nalaze se u rasponu vrijednosti od 19 do 22 mg/L TE. Od uzoraka bez dodatka EKM, najmanji antioksidacijski potencijal pokazali su uzorci s kominom rajčice, R i Rpr dok su uzorci s kominom mandarine pokazale nešto veće vrijednosti (Slika 20). U literaturi je pronađeno istraživanje u kojem je korišten ekstrakt listova masline (*Olea europaea*) u zelenoj sintezi nanočestica cinkovog oksida (Hashemi i sur., 2016). Antioksidacijski potencijal uzoraka mjeren je DPPH metodom, a rezultati su pokazali da je on ovisan o koncentraciji biljnog ekstrakta. Ova analiza pružila je znanstveni dokaz za visoko antioksidativno djelovanje ove biljke, što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom diplomskom radu.

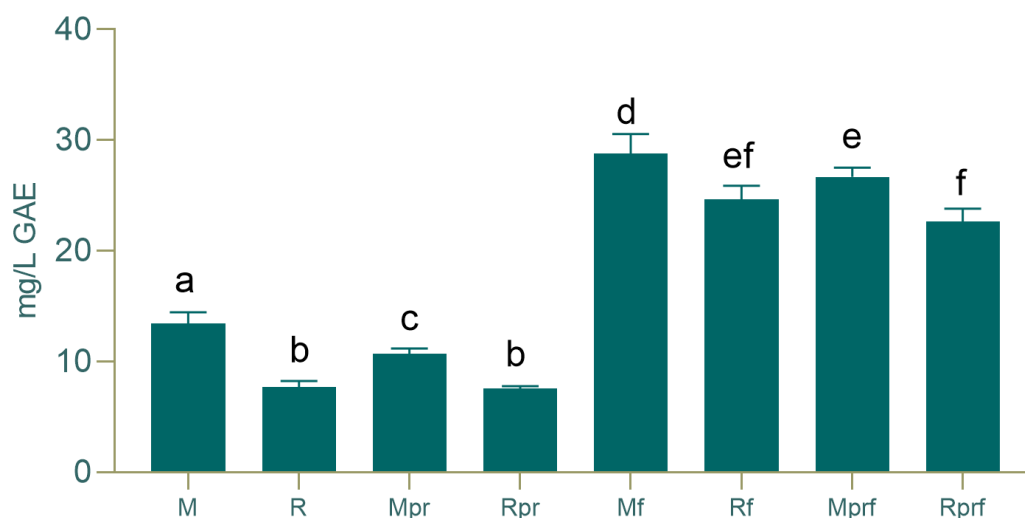


Slika 20. Grafički prikaz srednjih vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzoraka izražene kao TE (*Trolox Equivalent*)

*Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0,05$ )*

#### 4.4. Određivanje ukupnog antioksidacijskog potencijala uzoraka Folin-Ciocalteu metodom

Sve metode za mjerenje antioksidacijskog potencijala su različite i teško ih je uspoređivati jednu sa drugom. Zbog toga, zaključak o ukupnom antioksidacijskom potencijalu se ne može bazirati na rezultatima jedne metode već je poželjno koristiti kombinaciju metoda radi najboljih rezultata (Alahmad i sur., 2021). Cilj provođenja ove metode bio je usporedba rezultata s rezultatima dobivenim TEAC metodom kako bi se utvrdilo da uzorci s dodatkom EKM pokazuju veći antioksidacijski potencijal u odnosu na uzorke bez EKM. Rezultati određivanja ukupnog antioksidacijskog potencijala uzoraka Folin-Ciocalteu metodom interpretirani su kao ekvivalenti galne kiseline (Slika 21) pomoću baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline (Slika 14). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da svi uzorci pokazuju relativno visok antioksidacijski potencijal, ali uzorci s dodatkom EKM (Mf, Rf, Mprf i Rprf) pokazuju statistički značajno veći antioksidacijski potencijal u odnosu na ostale uzorke. Vrijednosti antioksidacijskog potencijala tih uzoraka nalaze se u rasponu vrijednosti od najmanje 22 do najviše 28 mg/L GAE. Rezultati su u skladu sa dobivenim vrijednostima antioksidacijskog potencijala mjerenim TEAC metodom. Zaključuje se da je komina masline značajan prirodni izvor polifenola koji pokazuju visok antioksidacijski kapacitet te bi bilo korisno iskoristiti je u daljnjim istraživanjima.



Slika 21. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ukupnog antioksidacijskog potencijala uzoraka izraženih kao GAE (*gallic acid equivalents*)  
Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0,05$ )

## 4.5. Procjena stabilnosti uzoraka

Zbog procjene stabilnost uzoraka, mjerenja veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala ponovljena su nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize. Dobiveni rezultati navedeni su u prethodnim poglavljima. Uzorcima je mjeren pH na pH-metru, 702 SM Titrino (Metrohm AG, Herisau, Švicarska) prije početka svakog mjerenja. pH je jedan od najvažnijih parametara o kojima ovisi zeta potencijal. S nižim pH povećat će se pozitivan naboj na površini čestice što će dovesti do povećanja vrijednosti zeta potencijala (Thakur i sur., 2020). Uzorci su svih dana mjerenja pokazali približno iste vrijednosti pH (oko 4) te je samo kod uzorka Rpr došlo do nešto veće promjene nakon 20 dana od početka analize. Prvog dana mjerenja pH je iznosio 4,3, a ta vrijednost ( $\pm 1$ ) se zadržala do 20. dana mjerenja kada je pH iznosio 5,21, a 30. dana 5,7. Također, uzorci su promatrani i golim okom radi uočavanja potencijalnih promjena u smislu boje, zamućenja, taloga i slično. Tek 20. dana mjerenja primijećeni su aglomerati u uzorku Rpr, a 30. dana mjerenja u svim uzorcima primijećen je određen stupanj zamućenja i pojave taloga/većih čestica što upućuje na to da je u uzorcima došlo do određenih promjena. Ipak, kako se radi o suspenzijama, pojava taloga stajanjem je očekivana pojava te bi se redispergiranjem taloga trebao ponovno dobiti homogen uzorak.



Slika 22. Pojava zamućenja/taloga u uzorku Rpr nakon 20. dana provođenja analiza (Fotografija snimljena tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)



## 5. ZAKLJUČCI

- Upotreba biootpada u zelenoj sintezi nanočestica selena, a i ostalih metala dala bi značajan doprinos iskorištavanju velike količine biootpada koja se iz dana u dan sve više generira, a također rezultati su pokazali da aktivne sastavnice biootpada poput bioaktivnih peptida, fenolnih spojeva, karotenoida i prehrambenih vlakana mogu biti jako korisni nutraceutici.
- Uzorci s pektinima iz komine rajčice pokazali su bolje rezultate u kontekstu manje veličine čestica ( $R=111,77\text{nm}$ ;  $R_{pr}=110,37\text{nm}$ ) i negativnijih vrijednosti zeta potencijala ( $R=-29,80\text{mV}$ ;  $R_{pr}=-28,17\text{mV}$ ) što ih čini boljim i stabilnijim odabirom od pektina iz komine mandarine.
- Dodatak ekstrakta komine masline uzorcima s pektinima kao stabilizatorima pokazuje statistički značajan doprinos povećanju antioksidacijskog potencijala uzoraka mjenog TEAC i FC metodom što ekstrakt komine masline čini značajnim prirodnim antioksidansom korisnim u zelenoj sintezi nanočestica selena ( $19\text{-}22\text{ mg/L TE}$ ;  $22\text{-}28\text{ mg/L GAE}$ ).
- U daljnjim istraživanjima trebalo bi se posvetiti sintezi nanočestica selena manjih od  $100\text{ nm}$  koje bi potencijalno imale naglašenije biološke učinke i pokazale bolje rezultate u kontekstu stabilnosti i biodostupnosti.

## 6. LITERATURA

Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2007, 2(4), 875–877.

Alahmad A, Feldhoff A, Bigall NC, Rusch P, Scheper T, Walter JG . Hypericum perforatum L.-mediated green synthesis of silver nanoparticles exhibiting antioxidant and anticancer activities. *Nanomaterials*, 2021, 11(2), 1–26.

Alam H, Khatoon N, Raza M, Ghosh PC, Sardar M. Synthesis and Characterization of Nano Selenium Using Plant Biomolecules and Their Potential Applications. *J Bionanosci*, 2019, 9(1), 96–104.

Alghuthaymi MA, Diab AM , Elzahy AF, Mazrou KE, Tayel AA, Moussa SH. Green Biosynthesized Selenium Nanoparticles by Cinnamon Extract and Their Antimicrobial Activity and Application as Edible Coatings with Nano-Chitosan. *J Food Qual*, 2021, 2021(4), 1-10.

Anticono M, Blesa J, Frigola A, Esteve MJ. High biological value compounds extraction from citruswaste with non-conventional methods. *Foods*, 2020, 9(6), 811.

Barik S, Paul KK, Priyadarshi D. Utilization of kitchen food waste for biodiesel production. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2018, 167, 11-13.

Basnet P, Chanu TI, Samanta D, Chatterjee S. A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *J Photochem Photobiol B*, 2018, 183, 201–221.

Caballero S, Li YO, McClements DJ, Davidov-Pardo G. Encapsulation and delivery of bioactive citrus pomace polyphenols: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 1–17.

Capanoglu, E., Nemli, E. and Tomas-Barberan, F. Novel Approaches in the Valorization of Agricultural Wastes and Their Applications. *J Agric Food Chem*, 2022.

Costa A, Marques M, Congiu F, Paiva A, Simões P, Ferreira A, Rosário Bronze M, Marto J, Margarida Ribeiro H, Simões S. Evaluating the presence of lycopene-enriched extracts from tomato on topical emulsions: Physico-chemical characterization and sensory analysis. *Appl Sci*, 2021, 11(11), 5120.

Čepo DV, Radić K, Jurmanović S, Jug M, Rajković MG, Pedisić S, Moslavac T, Albahari P. Valorization of olive pomace-based nutraceuticals as antioxidants in chemical, food, and biological models. *Molecules*, 2018, 23(8), 2070.

Difonzo G, Troilo M, Squeo G, Pasqualone A, Caponio F. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods-a review. *J Sci Food Agric*, 2021, 101(1), 15–26.

El-Ramady HR, Domokos-Szabolcsy É, Abdalla NA, Alshaal TA, Shalaby TA, Sztrik A, Prokisch J, Fári M. Selenium and nano-selenium in agroecosystems. *Environ Chem Lett*, 2014, 12(4), 495–510.

Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Hurst R. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signaling*, 2011, 14(7), 1337–1383.

Hallett, FR. Particle size analysis by dynamic light scattering. *Food Res Int*, 1994, 27(2), 195–198.

Hashemi S, Asrar Z, Pourseyedi S, Nadernejad N. Green synthesis of ZnO nanoparticles by Olive (*Olea europaea*). *IET Nanobiotechnol*, 2016, 10(6), 400–404.

Jagodić AM. Karakterizacija pektina ekstrahiranih iz komine rajčice i mandarine, 2020.

Jalab J, Abdelwahed W, Kitaz A, Rawaa Al-Kayali R. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Acacia cyanophylla* and its antibacterial activity. *Heliyon*, 2021, 7(9), e08033.

Kannah RY, Merrylin J, Devi TP, Kavitha S, Sivashanmugam P, Kumar G, Banu JR. Food waste valorization: Biofuels and value added product recovery. *Bioresour Technol Rep*, 2020, 11, 100524.

Khan UM, Sameen A, Aadil RM, Shahid M, Sezen S, Zarrabi A, Ozdemir B, Sevindik M, Kaplan DN, Selamoglu Z, Ydyrys A. Citrus genus and its waste utilization: a review on health-promoting activities and industrial application. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 2021, 2021, 2488804.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 2013, 18(2), 2328–2375.

Khurana A, Tekula S, Saifi MA, Venkatesh P, Godugu C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111, 802–812.

Kieliszek M, Bano I, Zare H. A Comprehensive Review on Selenium and Its Effects on Human Health and Distribution in Middle Eastern Countries. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 200(3), 971-987.

Kieliszek M, Błazejak S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. *Molecules*, 2016, 21(5), 609.

Kumar M, Tomar M, Bhuyan DJ, Punia S, Grasso S, Gomes Almeida Sa A, Augusto Mattar Carciofi B, Arrutia F, Changan S, Radha, Singh S, Dhumal S, Senapathy M, Satankarm V, Anitha T, Sharma A, Pandiselvam R, Amarowicz R, Mekhemar M. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. *Biomed Pharmacother*, 2021, 142, 112018.

Kurtagić H. Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 2017, 6(1), 28-35.

Martínez-Ballesta MC, Gil-Izquierdo A, García-Viguera C, Domínguez-Perles R, Nanoparticles and controlled delivery for bioactive compounds: Outlining challenges for new “smart-foods” for health. *Foods*, 2018, 7(5), 72.

Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body. *Molecules*, 2013, 18(3), 3292–3311.

Mellinas C, Jiménez A, Garrigós MDC. Microwave-Assisted Green Synthesis and Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Using Theobroma Cacao L. Bean Shell Extract. *Molecules*, 2019, 24(22), 4048.

Millan-Linares MC, Montserrat-de la Paz S, Martin ME. Pectins and olive pectins: From biotechnology to human health. *Biology*, 2021, 10(9), 860.

Miller NJ, 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 (1979)*, 1993, 84(4), 407-412.

Oldfield JE. Selenium World Atlas: Updated edition. Grimbergen, Selenium-Tellurium Development Association, 2002, str. 59.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 1999, 26(9-10), 1231-1237.

Ribeiro TB, Oliveira AL, Costa C, Nunes J, Vicente, Pintado M. Total and sustainable valorisation of olive pomace using a fractionation approach. *Appl. Sci*, 2020, 10(19), 6785.

Russo C, Maugeri A, Lombardo GE, Musumeci L, Barreca D, Rapisarda A, Cirimi S, Navarra M. The second life of citrus fruit waste: A valuable source of bioactive compounds, *Molecules*, 2021, 26(19), 5991.

Salopek B, Krasic D, Filipovic S. Measurement and application of zeta-potential. *Rud-Geol-Naftni Zb*, 1992, 4(1), 147-151.

Samimi S, Maghsoudnia N, Baradaran Eftekhari R, Dorkoosh F. Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. U: *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Kumar Mishra R, Thomas S, urednici, Amsterdam, Elsevier, 2019, str. 47-76.

Schauperl L. Mogućnosti primjene ekstrakta komine masline u sintezi nanoselena, 2020.

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

Steckiewicz KP, Inkielewicz-Stepniak I. Modified nanoparticles as potential agents in bone diseases: Cancer and implant-related complications, *Nanomaterials*, 2020, 10(4), 658.

Thakur, P. Sonawane SS, Sonawane SH, Bhanvase BA. Nanofluids-based delivery system, encapsulation of nanoparticles for stability to make stable nanofluids. U: *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System*. Sonawane SH, Bhanvase BA, Sivakumar M, urednici, Amsterdam, Elsevier, 2020, str. 141-152.

## **7. POPIS KRATICA, SLIKA I TABLICA**

### **Popis kratica**

ABTS- 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

DLS- Dynamic Light Scattering

FC- Folin-Ciocalteu

GA- gallic acid

GAE- gallic acid equivalents

HPLC- High-Performance Liquid Chromatography

MWCO- Molecular Weight Cut Off

PHB- Polihidroksibutirat

PHA- Polihidroksialkanoat

TE- Trolox Equivalent

TEAC- Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

### **Popis slika**

Slika 1. Kemijski oblici organskog selena

Slika 2. Uloga selena u organizmu

Slika 3. Usporedba veličine nanočestica s drugim objektima na logaritamskoj skali

Slika 4. Različite mogućnosti iskorištavanja biootpada

Slika 5. Upotreba otpada citrusa i važni bioaktivni spojevi (hesperidin, naringenin i kvercetin)

Slika 6. Proces prerade rajčice uz nastanak komine koja je značajan izvor likopena i ostalih bioaktivnih tvari

Slika 7. Postupak prerade ploda masline

Slika 8. Osnovne strukture fenolnih kiselina i flavonoida

Slika 9. Dijaliza otopina nanoselena na magnetskoj miješalici

Slika 10. Uzorci nanoselena spremni za analize

Slika 11. Kiveta DTS1070 za mjerenje zeta potencijala napunjena uzorkom

Slika 12. Zetaseizer Ultra korišten za mjerenje veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala

Slika 13. Baždarni dijagram ovisnosti postotka inhibicije (%I) tj. gašenja apsorbancije o koncentraciji Trolox-a ( $\gamma T$ )

Slika 14. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije mjerene pri 750nm (A) o koncentraciji galne kiseline ( $\gamma GA$ )

Slika 15. Raspodjela veličine čestica po intenzitetu raspršene svjetlosti za uzorke M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf

Slika 16. Grafički prikaz prosječne veličine nanočestica selena (nm) u uzorcima M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf

Slika 17. Promjena prosječne veličine nanočestica selena (nm) u uzorcima nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize radi procjene stabilnosti uzoraka

Slika 18. Srednje vrijednosti zeta potencijala uzoraka M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf

Slika 19. Promjena prosječnog zeta potencijala uzoraka nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize radi procjene stabilnosti uzoraka

Slika 20. Grafički prikaz srednjih vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzoraka izražene kao TE (*Trolox Equivalent*)

Slika 21. Grafički prikaz srednjih vrijednosti ukupnog antioksidacijskog potencijala uzoraka izraženih kao GAE (*gallic acid equivalents*)

Slika 22. Pojava zamućenja/taloga u uzorku Rpr nakon 20 dana provođenja analiza

## Popis tablica

Tablica 1. Sastav i količine potrebnih sastojaka za pripremu uzoraka M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf

Tablica 2. Shema pripreme mikrotitarske ploče za mjerenje antioksidacijskog potencijala pomoću TEAC i FC metode (B-blank tj. kontrolni uzorak)



## 8. SAŽETAK

Selen je esencijalni kemijski element za zdravlje živih organizama. U obliku nanočestica selen pokazuje veću biološku djelotvornost i manju toksičnost od anorganskog selenita te jednaku biološku učinkovitost, ali smanjenu toksičnost od selenometionina. Cilj ovog diplomskog rada bio je iskoristiti ekstrakte dobivene iz kome mandarine, rajčice i masline u biogenoj sintezi nanočestica selena.

U ovom radu sintetizirane su nanočestice selena stabilizirane sirovim i pročišćenim pektinima dobivenim iz kome mandarine i rajčice, a u polovicu uzoraka dodan je ekstrakt kome masline kako bi se proučile mogućnosti dodatne funkcionalizacije sintetiziranih nanosustava u smislu poboljšanja antioksidativne aktivnosti.

Dobiveni uzorci karakterizirani su kroz određivanje raspodjele veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala (DLS metoda) te određivanjem reduktivne i antiradikalne sposobnosti (TEAC i FC metoda). Također, analizirana je i stabilnost nanosustava ponavljanjem mjerenja veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize.

Uzorci stabilizirani pektinima kome rajčice pokazali su manje vrijednosti veličine čestica te negativniji zeta potencijal u odnosu na uzorke stabilizirane pektinima kome mandarine. Uzorci funkcionalizirani dodatkom ekstrakta kome masline pokazali su značajno veće vrijednosti antioksidacijskog potencijala (primjenom obje korištene metode) što pokazuje da je ekstrakt kome masline moćan prirodni antioksidans primjenjiv u biogenoj sintezi nanočestica selena. Buduća istraživanja trebala bi proučiti mogućnosti sinteze nanočestica selena manjih od 100 nm koje bi potencijalno pokazale bolje biološke učinke i veću stabilnost te istražiti biodostupnost i druge aspekte bioloških učinaka nastalih nanosustava.

## SUMMARY

Selenium is a chemical element essential for the health of living organisms. In the form of nanoparticles, selenium shows greater biological effectiveness and smaller toxicity than inorganic selenite, then also equal biological effectiveness, but reduced toxicity than selenomethionine. The objective of this graduate thesis was to use the extracts obtained from the pomace of tangerines, tomatoes and olives in biogenic synthesis of selenium nanoparticles.

For the purpose of this thesis, synthesised selenium nanoparticles were stabilized using crude and purified pectins obtained from the pomace of tangerines and tomatoes, while in one half of the samples olive pomace extract was added in order to study the possibilities of additional functionalisation of the synthesised nanosystems in terms of improvement of antioxidative activity. The obtained samples were characterized through determining particle size distribution, concentration and zeta potential (DLS method), then through determining reductive and antiradical ability (TEAC and FC method). Also, nanosystem stability was analysed by repeating the measurements of particle size, concentration and zeta potential after 2, 5, 9, 20 and 30 days from the beginning of the analysis.

The samples stabilized by tomato pomace pectins showed smaller particle size values and more negative zeta potential in relation to the samples stabilized by tangerine pomace pectins. The samples functionalized with the addition of olive pomace extract showed significantly greater values of antioxidative potential (using both applied methods) which indicates that olive pomace extract is a powerful natural antioxidant applicable in the biogenic synthesis of selenium nanoparticles. Future research activities should study the possibilities for synthesising selenium nanoparticles inferior to 100 nm, which would potentially show better biological effects and greater stability, but also explore bioavailability and other aspects of biological effects of the resulting nanosystems.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### PRIMJENA POLIFENOLA I PEKTINA IZ OTPADA HRANE U ZELENOJ SINTEZI NANOČESTICA SELENA

**Kristina Katelan**

#### SAŽETAK

Selen je esencijalni kemijski element za zdravlje živih organizama. U obliku nanočestica selen pokazuje veću biološku djelotvornost i manju toksičnost od anorganskog selenita te jednaku biološku učinkovitost, ali smanjenu toksičnost od selenometionina. Cilj ovog diplomskog rada bio je iskoristiti ekstrakte dobivene iz komine mandarine, rajčice i masline u biogenoj sintezi nanočestica selen. U ovom radu sintetizirane su nanočestice selen stabilizirane sirovim i pročišćenim pektinima dobivenim iz komine mandarine i rajčice, a u polovicu uzoraka dodan je ekstrakt komine masline kako bi se proučile mogućnosti dodatne funkcionalizacije sintetiziranih nanosustava u smislu poboljšanja antioksidativne aktivnosti. Dobiveni uzorci karakterizirani su kroz određivanje raspodjele veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala (DLS metoda) te određivanjem reduktivne i antiradikalne sposobnosti (TEAC i FC metoda). Također, analizirana je i stabilnost nanosustava ponavljanjem mjerenja veličine čestica, koncentracije i zeta potencijala nakon 2, 5, 9, 20 i 30 dana od početka analize. Uzorci stabilizirani pektinima komine rajčice pokazali su manje vrijednosti veličine čestica te negativniji zeta potencijal u odnosu na uzorke stabilizirane pektinima komine mandarine. Uzorci funkcionalizirani dodatkom ekstrakta komine masline pokazali su značajno veće vrijednosti antioksidacijskog potencijala (primjenom obje korištene metode) što pokazuje da je ekstrakt komine masline moćan prirodni antioksidans primjenjiv u biogenoj sintezi nanočestica selen. Buduća istraživanja trebala bi proučiti mogućnosti sinteze nanočestica selen manjih od 100 nm koje bi potencijalno pokazale bolje biološke učinke i veću stabilnost te istražiti biodostupnost i druge aspekte bioloških učinaka nastalih nanosustava.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 22 grafička prikaza, 2 tablice i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanočestice selen, biootpad, komina mandarine, komina rajčice, komina masline, zeta potencijal, veličina čestica, antioksidacijski potencijal, stabilnost

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Živka Juričić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Lovorka Vujić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj, 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### USE OF POLYPHENOLS AND PECTINS FROM FOOD WASTE IN GREEN SYNTHESIS OF SELENIUM NANOPARTICLES

**Kristina Katelan**

#### SUMMARY

Selenium is a chemical element essential for the health of living organisms. In the form of nanoparticles, selenium shows greater biological effectiveness and smaller toxicity than inorganic selenite, then also equal biological effectiveness, but reduced toxicity than selenomethionine. The objective of this graduate thesis was to use the extracts obtained from the pomace of tangerines, tomatoes and olives in biogenic synthesis of selenium nanoparticles. For the purpose of this thesis, synthesised selenium nanoparticles were stabilized using crude and purified pectins obtained from the pomace of tangerines and tomatoes, while in one half of the samples olive pomace extract was added in order to study the possibilities of additional functionalisation of the synthesised nanosystems in terms of improvement of antioxidative activity. The obtained samples were characterized through determining particle size distribution, concentration and zeta potential (DLS method), then through determining reductive and antiradical ability (TEAC and FC method). Also, nanosystem stability was analysed by repeating the measurements of particle size, concentration and zeta potential after 2, 5, 9, 20 and 30 days from the beginning of the analysis. The samples stabilized by tomato pomace pectins showed smaller particle size values and more negative zeta potential in relation to the samples stabilized by tangerine pomace pectins. The samples functionalized with the addition of olive pomace extract showed significantly greater values of antioxidative potential (using both applied methods) which indicates that olive pomace extract is a powerful natural antioxidant applicable in the biogenic synthesis of selenium nanoparticles. Future research activities should study the possibilities for synthesising selenium nanoparticles inferior to 100 nm, which would potentially show better biological effects and greater stability, but also explore bioavailability and other aspects of biological effects of the resulting nanosystems.

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

Thesis includes: 46 pages, 22 figures, 2 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Selenium nanoparticles, food waste, tangerine pomace, tomato pomace, olive pomace, zeta potential, particle size, antioxidant potential, 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*  
**Živka Juričić, 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*

The thesis was accepted: June, 2022.