

# Utjecaj probave na funkcionalna svojstva nanočestica

---

Mravičić, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:713057>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**



Repository / Repozitorij:

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



**Lana Mravičić**

**Utjecaj probave na funkcionalna svojstva  
nanočestica selena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost

[HRZZ-IP-2022-10-4597 i HRZZ-DOK-2021-02-6801]

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

*Zahvaljujem se prof.dr.sc Dubravki Vitali Čepo na stručnoj pomoći, strpljenju i savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistentici Nikolini Golub na velikoj pomoći i vremenu uloženom u izradu eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima koji su mi uvijek bili podrška tijekom studiranja i cijelog mog školovanja. Hvala što ste uvijek bili tu za mene i pomogli mi da ostvarim sve svoje ciljeve. Vama posvećujem ovaj diplomski rad.*

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Selen .....	1
1.1.1. Biološke uloge i status .....	1
1.1.2. Spojevi selena u hrani.....	1
1.1.3. Biološke uloge u organizmu .....	2
1.1.4. Inovativni oblici selena za <i>per os</i> primjenu .....	4
1.2. Nanočestice .....	4
1.2.1. Nanočestice selena.....	6
1.3. Pektini.....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Kemikalije i pribor.....	13
3.1.2. Instrumenti i oprema.....	14
3.1.3. Priprema reagensa .....	14
3.1.4. Dizajn istraživanja.....	15
3.2. Metode .....	15
3.2.1. Izrada nanočestica selena.....	15
3.2.2. Izrada ekstrakta komine masline.....	17
3.2.3. Određivanje gastrointestinalne stabilnosti nanočestica selena.....	18
3.2.4. Mjerenje koncentracije sintetiziranog nanoselena atomskom apsorpcijskom spektrometrijom.....	19
3.2.5. Određivanje raspodjele veličine nanočestica selena .....	21
3.2.6. Određivanje zeta potencijala nanočestica selena .....	22
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog potencijala nanočestica selena .....	23
3.2.8. Statistička obrada podataka .....	24
4. Rezultati i rasprava .....	25
4.1. Rezultati.....	25
4.1.1. Iskorištenje postupka sinteze nanočestica selena .....	25
4.1.2. Karakterizacija nanočestica selena prije <i>in vitro</i> simulacije probave .....	26
4.1.2.1. Raspodjela veličine nanočestica selena.....	26

4.1.2.2.	Indeks polidisperznosti nanočestica selena .....	28
4.1.2.3.	Zeta potencijal nanočestica selena .....	30
4.1.2.4.	Ukupni redukcijski potencijal nanočestica selena .....	31
4.1.3.	Karakterizacija nanočestica selena poslije <i>in vitro</i> simulacije probave .....	32
4.1.3.1.	Utjecaj simulacije probave na koncentraciju nanočestica selena .....	32
4.1.3.2.	Utjecaj simulacije probave na raspodjelu veličine nanočestica selena .....	34
4.1.3.3.	Utjecaj simulacije probave na indeks polidisperznosti nanočestica selena .....	39
4.1.3.4.	Utjecaj simulacije probave na zeta potencijal nanočestica selena .....	41
4.1.3.5.	Utjecaj simulacije probave na ukupni redukcijski potencijal nanočestica selena .....	43
4.2.	Rasprava .....	45
4.2.1.	Mogućnosti primjene pektina iz komete rajčice/kore mandarine kao stabilizacijskih sredstava u sintezi selenovih nanočestica .....	45
4.2.2.	Utjecaj funkcionalizacije površine selenovih nanočestica na antioksidacijski potencijal nanočestica i stabilnost tijekom probave .....	45
4.2.3.	Utjecaj funkcionalizacije površine selenovih nanočestica na veličinu i zeta potencijal nanočestica i stabilnost tijekom probave .....	47
5.	Zaključci .....	50
6.	Popis kratica, oznaka i simbola .....	52
7.	Literatura .....	54
8.	Sažetak/Summary .....	59
8.1.	Sažetak .....	59
8.2.	Summary .....	60

# 1. Uvod

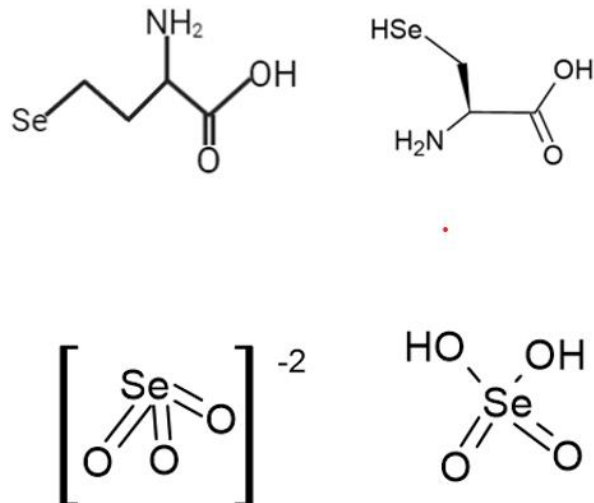
## 1.1. Selen

### 1.1.1. Biološke uloge i status

Selen (Se) je prvi put otkrio švedski kemičar Jons Jacob Berzelius 1817. godine. To je polumetalni element koji pripada istoj skupini u periodnom sustavu kao sumpor i kisik. Selen je esencijalni mikronutrijent koji se u prirodi nalazi u tragovima u organskom i anorganskom obliku. Nalazi se u tlu i hrani kao što su žitarice, povrće, mlijeko, meso i jaja. (Finley, 2006.) Njegova koncentracija varira ovisno o geografskoj lokaciji. Deficijencija je rijetka u SAD-u i Kanadi, ali neki dijelovi svijeta kao što su Novi Zeland, Kina i Rusija imaju znatno niže razine selena u tlu i hrani. Prema novim istraživanjima deficit selena zahvaća više od 15% populacije. (Zhou i sur.,2020.)

### 1.1.2. Spojevi selena u hrani

Prehranom se najviše unosi selenometionin. Razgrađuje se na aktivne metabolite kao što su vodikov selenid ( $H_2Se$ ) i metanselenska kiselina ( $CH_3SeO_2H$ ). (Avery i Hoffmann, 2019.) Za tijelo je iskoristiviji organski selen koji se uglavnom nalazi u obliku selenometionina (SeM) i selenocisteina (SeC). Najzastupljenije vrste anorganskog selena su selenit ( $SeO_3^{2-}$ ) i selenat ( $SeO_4^{2-}$ ). (Sun i sur., 2023.) Ima usku terapijsku širinu te pri neadekvatnoj primjeni može doći do nuspojava. Stoga se suplementacija preporučuje samo pojedincima s neadekvatnim statusom selena. (Rayman, 2012.)



**Slika 1. Strukture najzastupljenijih organskih i anorganskih oblika selena u namirnicama (izrađeno u programu ChemSketch)**

### 1.1.3. Biološke uloge u organizmu

Selen posjeduje antioksidativna, antimikrobna, imunoregulatorna, hipoglikemijska i antikancerogena svojstva, a važan je i za regulaciju hormona štitnjače. Također je dokazano da povoljno utječe na ravnotežu intestinalne mikrobiote. Studija Andersen i sur. (2018.) razmatra utjecaj selena i selenoproteina na upalne procese u crijevu i mikrobiotu. Selen zbog svojih antioksidativnih svojstava, može modulirati crijevnu mikrobiotu i smanjiti upalne procese u crijevima. Nadalje, ističe se kako selen može podržati rast dobrih bakterija u crijevima, što može imati pozitivan utjecaj na cjelokupno zdravlje i raznolikost mikrobiote.

U tijelu se ugrađuje u proteine kao 21.aminokiselina. Ugradnja ovog elementa u takozvane selenoproteine je ključ njegovog imunomodulatornog djelovanja.

Imunomodulatorni učinak selena se očituje preko povećanog izlučivanja citokina te time pojačavanje proliferacije T-limfocita. Također, pozitivno utječe na fagocitne sposobnosti i pokretljivost makrofaga, potiče prelazak proupalnih M1 makrofaga u protuupalne M2. (Sun i sur., 2023.) Selenoproteinski enzimi povezani s imunološkim funkcijama uključuju GPX, TXNRD, DIO, MSRB1 i SPS2. (Avery i Hoffmann, 2019.)

Selen smanjuje lipidnu peroksidaciju i oštećenje tkiva neutraliziranjem ROS-ova. Kao kofaktor glutation peroksidaze, selen omogućava pretvorbu hidroperoksida u hidroksilne masne kiseline,

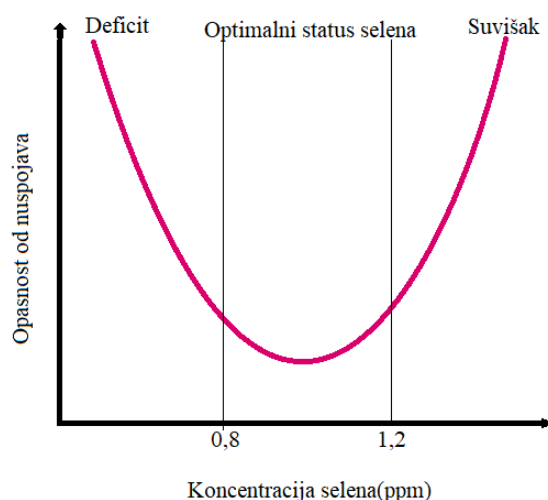
čime ograničava lipidnu peroksidaciju uzrokovanu slobodnim radikalima i smanjuje oksidativni stres. Visoke koncentracije ROS-ova u krvotoku uzrokuju oštećenje DNK i oksidativni stres u stanicama. Kada je sadržaj antioksidansa nizak ili su razine ROS-a visoke, stanice postaju sklone oksidativnom stresu. Selen može spriječiti prekomjerno stvaranje ROS-a, očuvati redoks stanje stanica i suzbiti oksidativni stres. (Sun i sur., 2023.)

Insuficijencija selena u organizmu povećava rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti, bolesti štitnjače, imunodeficijencije, AIDS-a i raka.

Selen igra ključnu ulogu u sintezi hormona štitnjače. Brojne studije su pokazale da adekvatan unos selena može smanjiti rizik od razvoja autoimunih bolesti štitnjače, kao što su Hashimotov tireoiditis i Gravesova bolest. (Van der Reijden i sur., 2015.) Suplementacija selenom može značajno smanjiti koncentraciju antitijela na tiroidnu peroksidazu kod pacijenata s autoimunim tireoiditisom, što ukazuje na njegovu potencijalnu terapijsku vrijednost. Pored toga, selen je važan za pravilno funkcioniranje enzima dejodinaza, koji su ključni za aktivaciju i deaktivaciju hormona štitnjače.

Trenutna istraživanja pokazuju nekonzistentne rezultate o utjecaju statusa selena na smanjenje rizika od raka i dijabetesa. Hipoteza da osobe s višom razinom selena u krvi imaju manji rizik od raka prostate nije potvrđena. (Vinceti i sur., 2018.) Na Slici 2. prikazana je U-krivulja koja opisuje kompleksan odnos doze i učinka selena kod raka i dijabetesa. Pretpostavlja se da antioksidacijska svojstva selena smanjuju oštećenja DNA i stanica, čime se smanjuje rizik od raka kod manjka selena u krvi. Također, ako je već došlo do formiranja tumora, višak selena može zaštititi stanice raka od apoptoze uzrokovane ROS-ovima. U slučaju kada je dnevni unos selena veći od preporučene doze, prooksidativni učinci anorganskog selena mogu imati mutageni učinak i uzrokovati tumore jetre. Ekspresija nekoliko selenoproteina s protuupalnim i antioksidacijskim učincima, potaknuta unosom anorganskog selena u optimalnim dozama, može pomoći u sprječavanju karcinogeneze jetre. (Constantinescu-Aruxandei i sur., 2018.).





**Slika 2. U-krivulja doze i učinka selena (izrađeno u programu Microsoft Paint)**

#### 1.1.4. Inovativni oblici selena za *per os* primjenu

Terapijska uloga selena je prepoznata 1957. kada je otkriveno da suplementacija malom dozom može smanjiti stopu nekroze jetre kod štakora. (Wang i sur., 2017.) Tradicionalni oblici suplementacije uključuju soli selena, aminokiseline i obogaćene kvasce. Također se koristi obogaćeno povrće iz porodice *Brassicaceae*, sjemenke se uzgajaju u okolišu bogatim natrijevim selenitom te ga tijekom razvoja konvertiraju u SeMet.

Primjer inovativnih oblika su nanočestice selena i selenizirani polisaharidi. Glavne karakteristike tih oblika su sporije oslobađanje, manja toksičnost, ciljano i kontrolirano djelovanje te smanjen broj nuspojava. Iako novi oblici nisu još u širokoj upotrebi, oni su prirodno dostupni i u tradicionalnim oblicima suplementacije. Nanočestice su pronađene u obogaćenim kvascima, a selenizirani polisaharidi u biofortificiranim gljivama. (Constantinescu-Aruxandei i sur.,2018.)

## 1.2. Nanočestice

Nanočestice su tvari kojima je raspon veličina od 1 do 1000 nm u 2 ili 3 dimenzije. Te su čestice stabilne i imaju veliku površinu. (Ferrari i sur.,2023.) Nanotehnologija je jedno od

najvećih postignuća 21. stoljeća. Ima primjenu u tehnologiji, medicini, prehrambenoj industriji, poljoprivredi itd. (Altammar, 2023.) Za široku primjenu su zaslužni visoka varijabilnost fizikalnih i kemijskih svojstava te mogućnost manipulacije istima.

Prema obliku, veličini i kemijskim karakteristikama svrstavaju se u naredne skupine: ugljične, metalne, keramičke, poluvodičke, lipidne i polimerne nanočestice. (Altammar, 2023.) Po metodi izrade dijele se na nanosfere i nanokapsule. Nanokapsule su čestice kod kojih je lijek zatvoren u šupljini okružen polimernim matriksom, dok se čestice kod kojih je lijek uklopljen ili adsorbiran na površinu nazivaju nanosfere. Ciljevi u dizajniranju nanočestica kao sustava dostave su kontrola veličine čestica, površinskih svojstava i oslobađanje farmakološki aktivnih tvari kako bi se postiglo ciljano djelovanje lijeka na terapijski optimalan način u određenoj lokaciji. Liposomi se istražuju kao potencijalni nosači s jedinstvenim prednostima, uključujući zaštitu lijekova od degradacije, ciljano mjesto djelovanja i smanjenje toksičnosti ili nuspojava, njihova primjena je ograničena zbog poteškoća kao što su niska učinkovitost inkapsulacije, brzo otpuštanje vodotopivih sastojaka liposoma i loša stabilnost skladištenja. S druge strane, prednosti polimernih nanokapsula u odnosu na liposome su povećana stabilnost lijekova/proteina i kontrolirano oslobađanje. (Mohanraj i Chen, 2006.)

Prednosti korištenja nanočestica kao sustava dostave lijeka uključuju: kontrolirano oslobađanje lijeka tijekom prijevoza i na mjestu lokalizacije, povećanje terapijske učinkovitosti i smanjenje nuspojava, visok utovar lijeka bez kemijskih reakcija, te mogućnost ciljanog usmjeravanja na određenu lokaciju pričvršćivanjem liganda za usmjeravanje ili korištenjem magnetske vodilice. Sustav se može koristiti za različite načine primjene, uključujući oralnu, nazalnu, parenteralnu, intraokularnu itd. (Mohanraj i Chen, 2006.)

Neki nedostaci koji su posljedica svojstava nanočestica su agregacija, potencijalna toksičnost, opsonizacija i nekontrolirano i naglo otpuštanje lijeka. Za prevenciju agregacije je važan zeta potencijal, električni potencijal čestica. Čestice kojima je zeta potencijal manji od  $-30$  mV ili veći od  $+30$  mV pokazuju stabilnost u suspenziji jer površinski naboj onemogućava agregaciju. Toksičnost može biti posljedica slučajnog inhaliranja lijeka te posljedična upala, fibroza i nekroza plućnog tkiva. Nadalje, može doći do agregacije i nakupljanja nanočestica u tkivima kao što su jetra, bubrezi i mozak. (Najahi-Missaoui i sur, 2021.) Opsonizacija predstavlja vezanje opsonina na nanočesticu pri čemu oni postaju meta našeg imunološkog sustava, odnosno fagocita. Na to se može utjecati promjenom omjera hidrofobnih i hidrofilnih molekula

na površini nanočestica. Brzo početno oslobađanje ili „*burst effect*“ uglavnom je pripisan slabo vezanom ili adsorbiranom lijeku na veliku površinu nanočestica. Promjenom metode adsorpcije lijeka može se utjecati na profil oslobađanja. (Mohanraj i Chen, 2006.)

Nanočestice metala i metaloida predstavljaju značajno područje istraživanja zbog svojih jedinstvenih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava. Metalne nanočestice, poput srebrnih, zlatnih i bakrenih nanočestica, te metaloidne nanočestice, poput selenovih i silicijskih nanočestica, pokazuju veliki potencijal u različitim primjenama, od medicinske terapije do industrijskih procesa. Srebrne nanočestice, primjerice, primjenjuju se zbog svojih antimikrobnih svojstava, koja ih čine idealnima za upotrebu u medicinskim uređajima i premazima za površine koje zahtijevaju sterilnost. (Rai i sur., 2009) S druge strane, zlatne nanočestice nalaze široku primjenu u dostavi lijekova zahvaljujući njihovoj biokompatibilnosti i mogućnosti funkcionalizacije. (Dreaden i sur., 2012) Općenito, metalne i metaloidne nanočestice pružaju nove mogućnosti za poboljšanje postojećih tehnologija i razvoj novih terapijskih mogućnosti. Njihova jedinstvena svojstva omogućuju primjenu u raznovrsnim područjima, ali također postavljaju izazove u pogledu sinteze, stabilnosti i biokompatibilnosti. Daljnja istraživanja usmjerena na razumijevanje interakcija ovih nanočestica s biološkim sustavima ključna su za njihovu sigurnu i učinkovitu primjenu.

### 1.2.1. Nanočestice selena

Nanočestice selena sadrže selen u elementarnom obliku ( $\text{Se}^0$ ) i istražuju se zbog svojih svojstava u nanomaterijalima i medicini. Selen je značajan u nanomaterijalima zbog svojih poluvodičkih, fotoelektričnih i katalitičkih svojstava (Sowmya i sur., 2023.). U medicinskom području, koristi se zbog veće biodostupnosti, mogućnosti modifikacije svojstava i smanjene toksičnosti. Glavni problem je nestabilnost elementarnog selena i njegov prelazak u inaktivni oblik. Čestice se mogu stabilizirati pektinima, kitozanim, polisaharidima, proteinima itd., a odabir stabilizatora utječe na njihova svojstva i oslobađanje u organizmu.

Nanočestice se sintetiziraju kemijskim, fizikalnim i biogenim metodama. Fizikalna metoda se naziva i „top-down“, a kemijska i biološka „bottom-up“. „Top –down“ pristup znači da je polazna molekula veća od nanočestica te da se njenim fragmentiranjem dobije nanočestica. u „bottom-up“ metodi polazne čestice su male molekule i atomi, čijim se spajanjem stvaraju nanostrukture. (Altammar, 2023.) Fizikalna sinteza uključuje metode kao što su laserska ablacija i ultrazvučno zračenje (Karthik i sur., 2024.) Kemijska sinteza koristi antioksidanse,

izvor selena i stabilizator nanočestica. (Constantinescu-Aruxandei i sur., 2018.) Biogena sinteza, popularna zbog isplativosti i niske toksičnosti, koristi mikroorganizme i biljke za stvaranje nanočestica. (Sowmya i sur., 2023.)

Nanočestice selena se istražuju zbog svoje moguće terapijske primjene u liječenju Alzheimerove bolesti, tumora, oštećenja jetre i antibiotske rezistencije. (Karthik i sur., 2024.) Alzheimerova bolest je neizlječiva bolest koja je vodeći uzrok demencije. Uzrok bolesti je nepoznat, ali smatra se da oksidativni stres može pridonijeti razvoju. (Scheltens i sur., 2022.) U Alzheimerovoj bolesti, Nanočestice selena mogu neutralizirati slobodne radikale u mozgu, sprječavajući oštećenje tkiva (Scheltens i sur., 2022.).

S porastom bakterijske rezistencije na antibiotike intenzivno se istražuju nove molekule za liječenje infekcija. Nanočestice zbog svoje veličine imaju mogućnost prodiranja i narušavanja biofilmova i membrana patogena. To je posebno važno budući da se mikrobna rezistencija često javlja putem obrambenih mehanizama stanične stijenke i membrane. Povećane koncentracije Se iona razbijaju stanične stijenke i narušavaju integritet stanične membrane, mijenjajući intracelularnu homeostazu, što rezultira smrću mikroba. (Karthik i sur., 2024.) Provedeno je istraživanje u kojem je dokazan sinergistički učinak nanočestica selena i lizozima u obliku nanohibrida. Lizozim je enzim prirodno prisutan u tijelu koji igra važnu ulogu u obrani od patogena. Učinak je ispitan na sojevima *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. (Vahdati i sur., 2020.)

Nanočestice selena se također koriste kao nosači za dostavu antikancerogenih lijekova, koristeći patofiziologiju tumorskih stanica. Nanočestice selena se bore protiv tumorskih stanica sprječavanjem rasta stanica, neutralizirajući karcinogene, obnavljajući imunološki sustav i potičući apoptozu. Manje čestice imaju jači antiproliferativni učinak zbog veće proizvodnje ROS-ova. (Sowmya i sur., 2023.)

U dijabetesu, Nanočestice selena mogu smanjiti oksidativni stres uzrokovan produljenom hiperglikemijom preko SOD, CAT i GSH-Px koji su ključni obrambeni mehanizmi organizma. (Karthik i sur., 2024.) U radu Karthik i sur. (2024.) prikazano jer da nanočestice imaju bolji učinak od drugih oblika selena koji su ispitani.

Funkcionalizacija površina nanočestica bioaktivnim tvarima omogućava nanočesticama da služe kao učinkoviti nosači bioaktivnih molekula, poput lijekova, gena i proteina. Ovaj proces

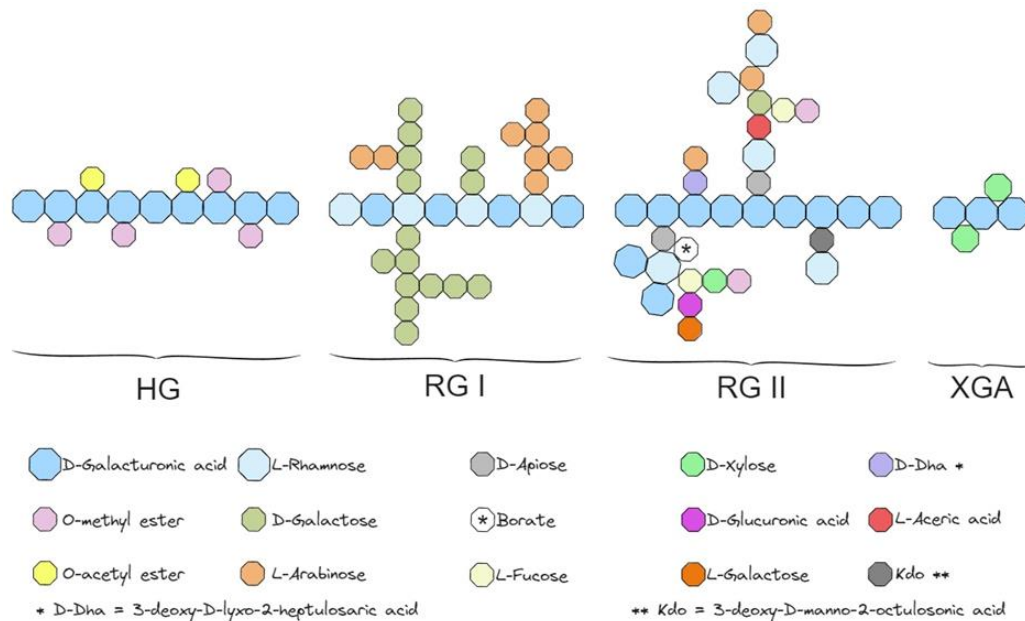
uključuje kemijsku modifikaciju površine nanočestica kako bi se omogućilo vezivanje specifičnih molekula koje mogu ciljano djelovati na određene stanice ili tkiva. Nanočestice funkcionalizirane polimerima, peptidima ili antitijelima mogu specifično prepoznati i vezati se za receptore na površini ciljnih stanica, čime se povećava učinkovitost i smanjuju nuspojave terapije. Osim toga, površinska funkcionalizacija može povećati stabilnost nanočestica u biološkim tekućinama i spriječiti njihovu brzu eliminaciju iz tijela. Kroz optimizaciju tih funkcionalizacija, nanočestice mogu biti dizajnirane za kontrolirano oslobađanje bioaktivnih tvari, omogućavajući preciznu i dugotrajnu terapiju. Ovaj pristup ima potencijal za značajno poboljšanje tretmana raznih bolesti i predstavlja važan korak prema personaliziranoj medicini. (Ahmad i sur., 2022.)

Karakterizacija nanočestica selena je ključna zbog njihove široke primjene i visoke biološke aktivnosti. Metode kao što su XRD, UV-vis spektroskopija, TEM, SEM i DLS koriste se za analizu veličine, oblika i stabilnosti čestica. (Sowmya i sur., 2023.)

### **1.3. Pektini**

Polisaharidi biljaka se mogu podijeliti na škrobne derivate i neškrobne polisaharide. Neškrobni polisaharidi su glavne gradivne jedinice stanične stijenke biljaka. Predstavnici te skupine su celuloze, hemiceluloze i pektini. (Dranca i Oroian, 2018.) Pektini su kompleksni polisaharidi koji se nalaze u staničnim stijenkama biljaka i igraju važnu ulogu u razvoju i obrani biljke od vanjskih utjecaja. (Ridley, 2000.) To su makromolekule s varijabilnim sastavom i velikom molarnom masom. Zajedničke strukturne karakteristike pektina su kostur građen od homogalakturonana, ramnogalakturonana I, ramnogalakturonana II i ksilogalakturonana. Osnovna struktura pektina je prikazana na Slici 3. Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu, struktura pektina mora sadržavati  $\geq 65\%$  galakturonske kiseline. Homogalakturonan čini 65% ukupnog pektina i sastoji se od linearnog homopolimera galakturonske kiseline djelomično esterificiranog metil esterima ( $\alpha$ 1-4 vezani) na položaju C-6 te acetil esterima na položajima O-2 i/ili O-3. Ramnogalakturonan I čini 20–35% pektina i sastoji se od ponavljajućih disaharida sastavljenih od ostataka galakturonske kiseline i ramnoze. Ramnogalakturonan II čini manje od 10% pektina i ima osnovu sastavljenu od galakturonske kiseline (7–9 jedinica), a složene grane sadrže 12 vrsta monosaharida. Ksilogalakturonan čini manje od 10% pektina i ima visoko složenu razgranatu strukturu povezanu  $\beta$ -glikozidnom vezom s galakturonskom kiselinom na

položaju O-3 u homogalakturonanu. Pektini se dijele na visoko i nisko esterificirane. (Freitas i sur., 2021.)

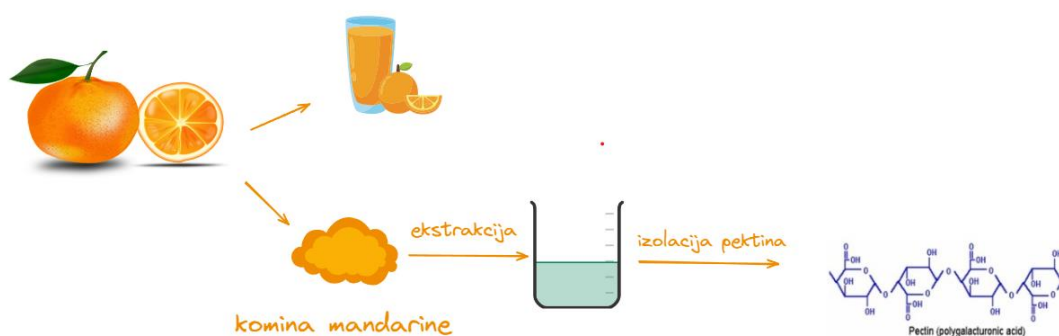


**Slika 3. Prikaz strukture pektina (izrađeno u programu Excalidraw)**

Jedno od svojstava pektina je sposobnost da stvaraju gelove. Visoko esterificirani pektini stvaraju gelove pri  $\text{pH} < 3.5$ , a nisko esterificirani u  $\text{pH}$  rasponu od 2 do 6, uz dostatnu količinu kationa. (Freitas i sur., 2021.)

Usprkos sličnostima pokazuju brojne funkcionalne različitosti, zbog čega su predmet brojnih istraživanja. Strukturne razlike potiču od izvora pektina, oblika ekstrakcije, stupnja esterifikacije, prisutnosti ferulične kiseline i proteina, itd. Identifikacija i karakterizacija strukture se uglavnom provodi masenom spektroskopijom, NMR-om, HPLC-om ili elektroforezom. (Freitas i sur., 2021.)

Glavni industrijski izvori pektina su kora citrusa i jabuke. Nusprodukt proizvodnje soka od jabuke i citrusa se suši te se iz njega izoliraju pektini. Prednost citrusa je što sadrže veću količinu pektina. (Dranca i Oroian, 2018.) Moderna industrija istražuje mogućnosti ekstrakcije pektina iz nusprodukata prehrambene industrije. Provedena je ekstrakcija iz komine masline, banane, lubenice, kave, itd. Pomno se istražuje mogućnost ekstrakcije pektina iz komine rajčice i mrkve jer su to važne namjernice u nekim dijelovima svijeta.



**Slika 4. Shema postupka izolacije pektina iz kore mandarine (izrađeno u programu Excalidraw)**

Slika 4. prikazuje proces izolacije pektina iz komine mandarine. Komina masline se dobije mehaničkim tiještenjem plodova tijekom proizvodnje ulja. Bogata je hranjivim tvarima te se koristi kao gnojivo. Najvrjedniji dio komine su fenolne frakcije koje čine 98% ukupnih fenola ploda. Te frakcije su oleuropein, luteolin i hidroksitirozol i važne su zbog svojih antioksidativnih svojstava. (Coimbra i sur., 2010.)

Rajčica se koristi za proizvodnju pelata, koncentrata, umaka i sokova. Kominu rajčice čini kora, sjemenke i dio pulpe. Bogata je proteinima, vlaknima, likopenima i pektinima. Pektini čine oko 8% suhe mase te komine. (Dranca i Oroian, 2018.)

Tradicionalne metode ekstrakcije uključuju obradu materijala kako bi se spriječila razgradnja pektina i razmnožavanje bakterija. Ekstrakcija se provodi s mineralnim kiselinama uz povišenu temperaturu. Brojna istraživanja su proučavala mogućnosti optimizacije promjenom vrste kiseline, pH i vremena ekstrakcije. Zaključeno je da je limunska kiselina prihvatljivije otapalo od jakih kiselina. Neka od mogućih objašnjenja su pretjerana razgradnja pektina i velika količina otpadnih otapala. (Coimbra i sur., 2010.)

Procvat zelene tehnologije je rezultirao razvojem novih metoda kao što su mikrovalna, enzimska i ultrazvučna ekstrakcija. (Freitas i sur., 2021.) Te su metode sofisticiranije i teže za provođenje od tradicionalnih, ali ostavljaju manji trag na okoliš. Danas je velik broj istraživanja usmjeren na optimiziranje tih metoda.

Pektini imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji gdje se koriste za geliranje, emulgiranje, stabiliziranje i kao biorazgradivo pakiranje hrane. Sposobnost emulgiranja raste s količinom proteina u pektinu, brojem acetiliranih skupina te također ovisi o pH i molekularnoj masi. Kao biorazgradivo pakiranje može imati različite namjene, može se kombinirati sa sladilima, želatinom, škrobom, askorbinskom kiselinom, itd. s ciljem produživanja roka trajanja namirnica. (Freitas i sur., 2021.)

Već spomenuta svojstva pektina kao što su geliranje u kiselom mediju, velika molekulska masa i bioaktivna svojstva reaktivnih domena rezultirala su primjenom pektina u biomedicinskom području. Posebno je zanimljiva primjena pektina u preparatima za mršavljenje i kod snižavanja kolesterola. Geliranje pri niskom pH pridonosi osjećaju sitosti te olakšava gubitak tjelesne mase. Svojstva snižavanja razine kolesterola u krvi se pripisuju molekularnoj masi, viskoznosti, alkilaciji i acilaciji. Također se mogu u obliku hidrogelova koristiti za oblaganje rana kako bi se ubrzalo zarastanje. (Freitas i sur., 2021.) Imaju velik značaj u oblikovanju lijekova. Pektini se koriste u izradi matriksa lijekova s kontroliranim oslobađanjem i kao sredstva za oblaganje. Acidorezistentni su i otporni na probavne enzime te omogućuju dostavu lijekova u kolon. U kolonu se razgrađuju pod utjecajem pektolitičkih enzima i posljedično dolazi do otpuštanja lijeka iz matriksa. (Chandel i sur.,2022.)



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Selen je esencijalan nutrijent, a njegov nedostatan unos hranom i vodom relativno je čest u općoj populaciji. Stoga se selen često koristi kao jedna od esencijalnih sastavnica dodataka prehrani i to uglavnom u obliku anorganskih soli koje karakterizira vrlo uska terapijska širina. Zbog navedenog se sve veći naponi ulažu u razvoj inovativnih oblika selena za peroralnu primjenu, među kojim se u posljednje vrijeme sve više istražuje elementarni selen u obliku nanočestica kojeg karakterizira manja toksičnost i bolja bioraspoloživost. Dodatna prednost primjene selena u obliku nanočestica je činjenica da se površinu nanočestica može na jednostavan način funkcionalizirati drugim biološki aktivnim spojevima (čime se širi spektar mogućih terapijskih učinaka inovativnog pripravka).

Glavni cilj ovog rada bio je razviti postupak zelene sinteze nanočestica Se, istražiti mogućnosti funkcionalizacije njihove površine prirodnim antioksidansima i to na način da se kao pomoćne tvari u sintezi koriste isključivo spojevi koje je moguće jednostavnim i zelenim postupcima izolirati iz prehrambenog otpada. Dodatni ciljevi rada bili su istražiti na koji način proces probave utječe na fizikalno-kemijska svojstva inovativnih formulacija te njihovu reduktivnu sposobnost.

Dobiveni rezultati pridonijet će trenutnim saznanjima o mogućnostima održivih postupaka formulacije visokovrijednih oblika selena za peroralnu primjenu, koji se u potpunosti uklapaju u koncepte kružne ekonomije, a moguće rezultiraju razvojem inovativnih oblika nutraceutika za peroralnu primjenu poboljšanih biofarmaceutskih svojstava.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije i pribor

- Natrijev selenit (Sigma-Aldrich, SAD)
- (L)-askorbinska kiselina (Gram-mol, Hrvatska)
- Kalijev klorid (Gram - mol, Hrvatska)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenkarbonat (Lach-Ner, Češka)
- Natrijev klorid (Kemig, Hrvatska)
- Magnezijev klorid heksahidrat (Merck, Njemačka)
- Kalijev persulfat (Fisher Scientific, SAD)
- ABTS (Sigma-Aldrich, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- Bezvodni  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Lach-Ner, Češka)
- Standard Se 1000 mg/L (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Dušična kiselina ( $\text{HNO}_3$ ) 65% (Kemika, Hrvatska)
- Ultračista voda (MiliQ  $\text{H}_2\text{O}$ )
- Falcon kivete
- Tikvice s okruglim dnom
- Eppendorf kivete
- Odmjerne tikvice
- Staklene čaše
- Multikanalna pipeta
- Staklene vijale
- Mikrotitarska pločica s 96 jažica (Thermo Fisher Scientific 130188, SAD)

### 3.1.2. Instrumenti i oprema

- Analitička vaga, Metler Toledo AB265S
- pH-metar, 702 SM Titrino (Metrohm AG, Švicarska)
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L (UZUSIO, Japan)
- Inkubator (Inko, Hrvatska)
- Rotavapor (Buchi , Švicarska)
- Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija)
- Čitač mikrotitarskih pločica (Multimode Plate Reader – Victor X3, Perkin Elmer, SAD)
- Atomski apsorpcijski spektrometar AAnalyst 800 (Perkin Elmer Instruments, SAD)

### 3.1.3. Priprema reagensa

- **Otopina L-askorbinske kiseline (1 M):** - izvaže se 1,762 g L-askorbinske i otopi u 10 mL ultračiste vode
- **Otopina Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0.1 M)-** 172,9 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> se otopi u 10 mL ultračiste vode.
- **Otopina pektina (5 g/L)** - 15 mg pektina izvaže se direktno u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 ml, doda se potrebna količina ultračiste vode i zatvori parafilmom. Postaviti na magnetsku miješalicu i ostaviti preko noći.
- **1% otopina HNO<sub>3</sub>** - razrijedi se 2,5 ml koncentrirane HNO<sub>3</sub> u odmjernoj tikvici od 250 ml dodavanjem ultračiste vode. Otopina je korištena za pripremu standarda selena i razrjeđivanje uzoraka
- **Otopina natrijevog karbonata-** odvaže se 7,4192 g natrijevog karbonata i otopi u 100 ml miliQ vode kako bi se dobila 700 mM otopina. Ukoliko je potrebno otopina se može zagrijati na 40 °C na magnetskoj miješalici kako bi se pospješilo otapanje
- **Otopina galne kiseline-** pripreme se otopine 100 mg/L–3 mg/L galne kiseline u miliQ vodi
- **Ekstrakt komine masline (10 g/L)** – Izvaže se 400 mg ekstrakta komine masline i otopi u 40 mL vode. Profiltrira se kroz filter.
- **Otopina za simulaciju gastrične faze** – pomiješaju se reagensi u količinama navedenim u Tablici 1.
- **Otopina za simulaciju intestinalne faze** - pomiješaju se reagensi u količinama navedenim u Tablici 1.

**Tablica 1. Priprema otopina za simulaciju želučane i crijevne probave**

	Stock koncentracije		Stock priprema		SGF (pH 3)		SIF (pH 7)	
	g/L	M	m (mg)	V (mL)	V stock (mL)	Finalna koncentracija (mM)	V stock (mL)	Finalna koncentracija (mM)
KCl	37,3	0,5	746	20	8,625	6,9	8,5	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0,5	340	5	1,125	0,9	1	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	8400	100	15,625	25	53,125	85
NaCl	117	2	5850	50	14,75	47,2	12	38,4
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	30,5	0,15	153	5	0,5	0,12	1,375	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0,5	96	2	0,625	0,5	-	-
HCl	-	6	-	5	1,625	15,6	0,875	8,4

**KCl**- kalijev klorid, **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**- kalijev dihidrogenfosfat, **NaHCO<sub>3</sub>**- natrijev hidrogenkarbonat, **NaCl**- natrijev klorid, **MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O**- Magnezijev klorid heksahidrat, **(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**- amonijev karbonat, **HCl**- kloridna kiselina, **SGF**- simulated gastric fluid, **SIF**- simulated intestinal fluid

### 3.1.4. Dizajn istraživanja

- Sinteza nanočestica
- Izrada ekstrakta komine masline
- Stabilizacija sirovim i pročišćenim pektinom iz kore mandarine i komine rajčice
- Funkcionalizacija površine pektina polifenolima iz ekstrakta komine masline
- Određivanje gastrointestinalne stabilnosti analizom raspodjele veličine, zeta potencijala i antioksidacijskog potencijala nanočestica

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izrada nanočestica selen

Prema količinama reagensa navedenima u Tablici 2., izrade se nanočestice selen.

Tablica 2. Priprema uzoraka nanočestica selena

	Oznaka uzorka	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (0.1M)/mL	L-ask (1M)/ mL	EKM(1 %)	Pektin (0.05 %)/ mg	Voda/mL	Ukupni volumen/ml
1	<b>M</b>	1	1	0	15	28	30
2	<b>Mpr</b>	1	1	0	15	28	30
3	<b>Mf</b>	1	1	5	15	23	30
4	<b>Mprf</b>	1	1	5	15	23	30
5	<b>R</b>	1	1	0	15	28	30
6	<b>Rpr</b>	1	1	0	15	28	30
7	<b>Rf</b>	1	1	5	15	23	30
8	<b>Rprf</b>	1	1	5	15	23	

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>** –natrijev selenit, **L-ask** – L-askorbinska kiselina, **EKM**-ekstrakt komine masline

U unaprijed pripremljene smjese pektina i vode prvo dodaje se L-askorbinsku kiselinu, a potom kap po kap Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, u volumenima prikazanim u Tablici 2. Važno je da se selenit dodaje brzinom 1 kap/2 sekunde. Tijekom postepenog dodavanja možemo pratiti promjenu boje u crvenu zbog redukcije selenita i nastajanja Se<sup>0</sup> (Slika 5.) Smjesa se nakon dodavanja selenita nastavi miješati još 20 min te se onda prebacuje u dijalizijske membrane i pročišćava.



**Slika 5. Sinteza nanočestica selena (fotografirano tijekom izrade diplomskog rada)**

Reakcijske smjese su pročišćavane postupkom dijalize koja se provodi kako bi se uklonio suvišak pektina i L-askorbinske kiseline te odvojio od novosintetiziranih nanočestica selena.

Dijalizijske membrane je potrebno pripremiti prije upotrebe. Izrežu se membrane duljine 13.5-14 cm, stijenke se razdvoje te se urone u vodu. Vodu je potrebno promijeniti 3 puta dok se membrane natapaju u vodi tijekom noći. Natapanjem se uklanjaju ostatci glicerola.

Kraj membrane se preklopi dva puta i zakači štikaljkom kako sadržaj ne bi curio van. Doda se 30 ml suspenzije nanočestica selena te se gornji vrh zakači kao i gornji. Postupak se ponovi za svih osam uzoraka. Membrane se u potpunosti urone u vodu preko noći u posudu zapremnine 1000 ml. Pričvrste se nosačima uz rub čaše kako bi sve bile jednoliko uronjene. Vodu je potrebno promijeniti 3 puta – nakon 3 sata, 4-5 sati i nakon noći.

Dijalizirani uzorci se prebace u tikvicu s okruglim dnom te upare na rotavaporu na volumen od 3 ml. Upravljanje se provodi na temperaturi od 60 °C. Zatim se uzorci prebace u staklene vijale i zapiše se volumen. Tako pripremljeni uzorci su spremni za daljnja ispitivanja.

### **3.2.2. Izrada ekstrakta komine masline**

Komina masline uzeta je iz dvofaznog mlina nakon proizvodnje maslinovog ulja, osušena, usitnjena, prosijana na situ promjera 0,8 mm te odmašćena s petroleterom pomoću Soxhlet ekstraktora. Tako pripremljen uzorak ekstrahirao se korištenjem 60 % etanola tijekom 2 sata na 70 °C u vodenoj kupelji uz miješanje. Ekstrakt je profiltriran te uparen na 50 °C kako bi se

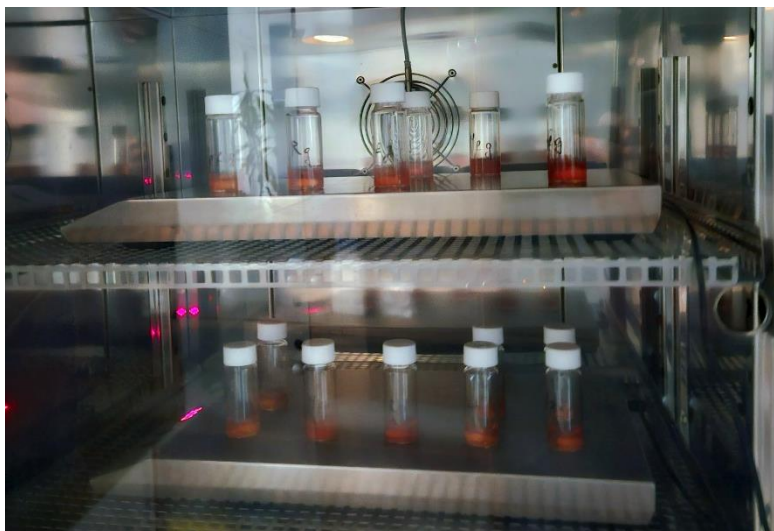
uklonio etanol i omogućilo smrzavanje uzorka na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Smrznuti ekstrakti komine masline su liofilizirani kako bi se očuvale vrijedne sastavnice te skladišteni na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.

### 3.2.3. **Određivanje gastrointestinalne stabilnosti nanočestica selena**

Stabilnost Nanočestica selena ispitana je na način da su Nanočestice podvrgnute simuliranim uvjetima probave prema modificiranoj INFOGEST metodi. INFOGEST metoda je jedina standardizirana *in-vitro* metoda mjerenja probavljivosti nutrijenata. (Brodkorb i sur., 2019.) Utjecaj probave se ispituje mjerenjem veličine čestica te zeta potencijala. Potrebno je uzeti dvije paralele uzoraka – prva se podvrgava samo gastričnoj fazi, a druga gastričnoj i intestinalnoj kako bi se mogli usporediti utjecaji različitih faza probave.

Ukratko, u volumenu od 300-600  $\mu\text{l}$  koncentrirane suspenzije Nanočestica se dodaje 4,167 ml SGF 1,25x. SGF-u je potrebno provjeriti pH na pH-metru te po potrebi podesiti na 3 dodatkom 6M HCl. Obje paralele se vorteksiraju kako bi se homogenizirale te se inkubiraju na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 sata u inkubatoru. (Slika 6.) Uzorci se neprestano miješaju na magnetnom mješaču. Nakon 2 sata gastričnoj paraleli se mjeri veličina čestica te zeta potencijal, a intestinalna paralela se podvrgava simulaciji probave.

Drugoj paraleli se dodaje 4 ml SIF-a te se vorteksira i inkubira 2 sata na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  na isti način kao i u prethodnom koraku. Tim uzorcima se također mjeri veličina čestica i zeta potencijal. Ostaci prve i druge paralele se spremaju za određivanje antioksidacijskog potencijala.



**Slika 6. *In vitro* simulacija gastrične i intestinalne faze probave u inkubatoru (fotografirano tijekom izrade diplomskog rada)**

#### **3.2.4. Mjerenje koncentracije sintetiziranog nanoselena atomskom apsorpcijskom spektrometrijom**

Udio selena u uzorcima izmjeren je s pomoću atomskog apsorpcijskog spektrofotometra. Uzorak se s pomoću plastične cjevčice unosi u instrument gdje dolazi do procesa atomizacije i izlaganja linijskom zračenju valne duljine karakteristične za selen. Promjena intenziteta zračenja, tj. analitički signal očitava se s pomoću detektora. Uzorci se prije mjerenja apsorbcije atomiziraju jer slobodni atomi apsorbiraju energiju zračenja određenih valnih duljina koje se odvajaju monokromatorom te se na kraju detektorom pretvaraju u mjerni signal koji se očitava. Ova metoda prati Beer Lambertov zakon prema kojemu je:

$$A = \varepsilon x l x c$$

A - apsorbcija pri danoj valnoj duljini, c - molarna koncentracija otopine ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ), l -duljina uzorka kroz koji prolazi svjetlost (cm),  $\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{dm}^3 / \text{mol cm}$ ) (Beatty i Kerber, 1993)

Intenzitet svjetlosti koje apsorbiraju čestice povećava se proporcionalno koncentraciji otopine. Uzorci i standardi su mjereni u triplikatu i njihove srednje vrijednosti su uzete za izradu kalibracijske krivulje.



Analiza uzoraka je provedena pomoću atomskog apsorpcijskog spektrofotometra. U ovom eksperimentu je korišten standard Se u koncentraciji od 1000 mg/L, a uzorci su pripremljeni razrjeđivanjem standarda s 1 % HNO<sub>3</sub>.

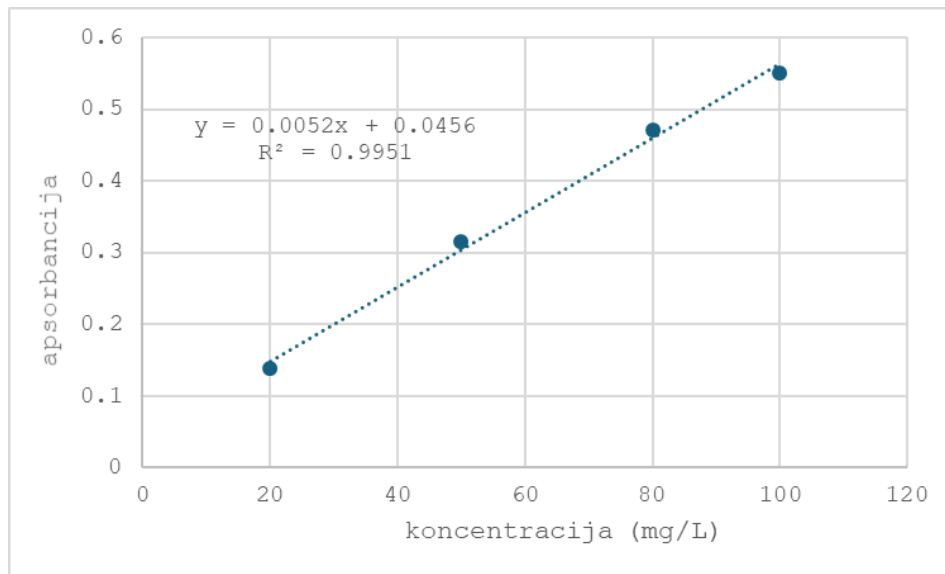
Mjerenja su provedena u triplikatu. Svaki uzorak je razrijeđen u falcon epruvetama od 15 ml, a za razrjeđivanje je korištena ultračista voda s dodatkom 1 % HNO<sub>3</sub> kako bi se postigla koncentracija unutar raspona definiranih baždarnom krivuljom. Upareni uzorci razrijeđeni su 50 puta, uzorci koji su prošli simulaciju gastrične probave 4 puta, a uzorci koji su prošli simulaciju intestinalne probave 2 puta. Koncentracije uzoraka se iščitavaju iz baždarnog dijagrama.

Izrada baždarnog dijagrama u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji (AAS) uključuje pripremu standardnih otopina poznatih koncentracija analita. Standardi se mjere kako bi se dobile njihove apsorbancije, koje se zatim koriste za konstrukciju grafa apsorbancije u odnosu na koncentraciju. Koncentracije uzoraka se računaju po sljedećoj formuli (Skoog, Holler i Crouch, 2006)

$$C_{uzorka} = (A - b) / m$$

$C_{uzorka}$  - koncentracija uzorka, A - apsorbancija, m-nagib, b - presjek na y-osi

Za izradu baždarnog dijagrama najprije se izradi otopina 1 % HNO<sub>3</sub> od koje se napravi koncentracijski niz s koncentracijama od 20, 50, 80 i 100 mg/L. Baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji uzorka je prikazan na Slici 7.



**Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije selena u otopini**

### 3.2.5. Određivanje raspodjele veličine nanočestica selena

DLS metodom može se odrediti raspodjela veličine nanočestica. To je metoda koja procjenjuje veličinu čestica na temelju Brownovog gibanja čestica u otopini. Brownovo gibanje predstavlja nasumično kretanje molekula u otopini koje nastaje zbog sudaranja molekula s molekulama otapala koje ih okružuju. Veće čestice gibaju se sporije jer imaju veću masu i inerciju, dok se manje čestice gibaju brže zbog manjeg otpora pri sudarima s molekulama otapala. Ova metoda mjeri hidrodinamički promjer čestica jer su one u otopini konstanto okružene slojem otapala. Stokes-Einsteinova jednadžba za mjerenje hidrodinamičkog promjera je (Hackley i Clogston, 2016.)

$$d_H = kT / 3\pi\eta D$$

k-Boltzmannova konstanta, T-temperatura,  $\eta$ -apsolutna viskoznost medija pri nultom smicanju, D-koeficijent difuzije

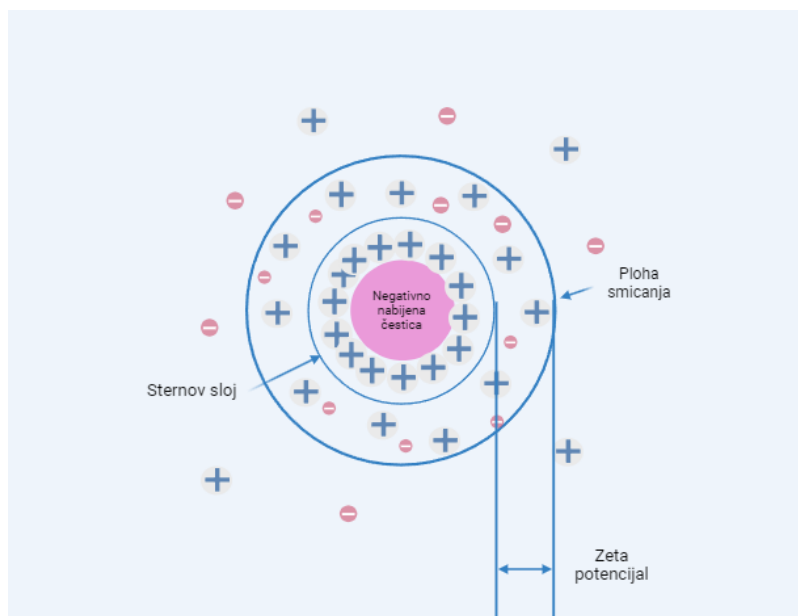
DLS je mjereno zetasizerom. Uzorci se razrijede 150x te se stavljaju u kivetu i mjere u triplikatu. Mjerenje se provodi na 25 °C.

### 3.2.6. Određivanje zeta potencijala nanočestica selena

U ionskoj otopini, nabijene nanočestice su okružene slojevima čestica suprotnog naboja. Prvi sloj uz česticu se naziva Sternov sloj i u tom sloju je suprotni naboj čvrsto vezan uz nanočesticu. Drugi, difuzijski sloj se naziva Gouy-Chapmanov sloj.

Ako se ta otopina izloži električnom polju, nabijene nanočestice se krenu pomicati prema suprotno nabijenoj elektrodi. Zajedno s nanočesticama se kreće i električni dvosloj. Plohu smicanja čine Sternov sloj i dio vezanih molekula otapala. Zeta potencijal označava elektrostatski potencijal na plohi smicanja. (Slika 8.) Taj parametar značajno utječe na stabilnost čestica. Uzorci s potencijalom između -10 mV i 10 mV se smatraju neutralnima te kod njih postoji veća šansa za koagulaciju i flokulaciju. Čestice s potencijalom većim od 30 mV ili manjim od -30 mV se smatraju stabilnima. (Clogston i Patri, 2011.)

Zeta potencijal se mjeri na Zetasizeru pri konstantnoj temperaturi i pH. Uzorci se razrjeđuju 150 puta kako bi se postiglo razrjeđenje pri kojem uređaj može izmjeriti vrijednost zeta potencijala. 20  $\mu$ l se uzorka stavi u pripremljenu kivetu te se zeta svakog uzorka se mjeri u triplikatu. Mjerenje se provodi na 25°C.

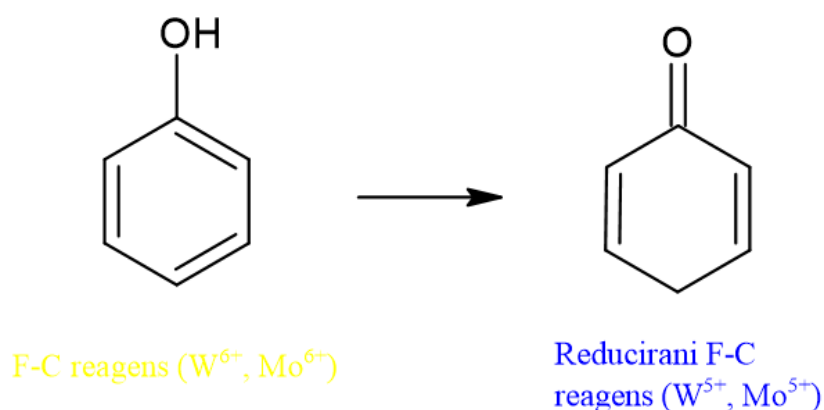


Slika 8. Zeta potencijal nanočestice (izrađeno u programu Biorender)

### 3.2.7. Određivanje antioksidacijskog potencijala nanočestica selena

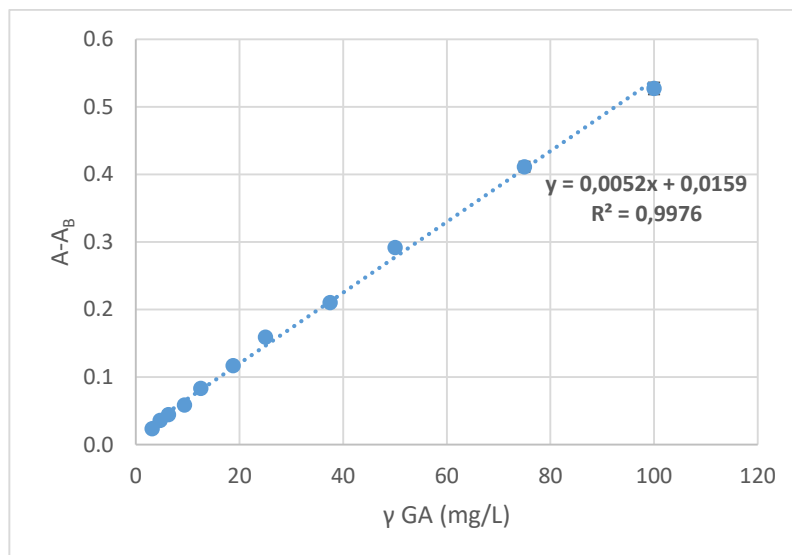
Za određivanje antioksidacijskog potencijala iskorištena je metoda Folin-Ciocalteu, kojom se odredio ukupni redukcijski potencijal.

Postupak mjerenja redukcijskog potencijala nanočestica proveden je prema postupku Ainsworth i Gillespie (2007.). Koristi se za predviđanje sadržaja fenola i ostalih oksidansa. Vrlo je jednostavna metoda i reakcija se temelji na reakciji uzorka s Folin-Ciocalteu reagensom. Reagens se sastoji od smjese fosfovolframata i fosfomolibdata. Aktivne skupine reagiraju s hidroksilnim skupinama te boja smjese prelazi iz žute u plavu. (Slika 9.) Intenzitet obojenja je proporcionalan udjelu komponenti s redukcijskim potencijalom te se mjeri spektrofotometrijski na 750 nm. Interferirajuće tvari su askorbinska kiselina te neki reducirajući šećeri. Kako bi se uklonio njihov utjecaj potrebno je provesti još neku metodu ispitivanja antioksidacijskog potencijala.



Slika 9. Osnovni mehanizam Folin-Ciocalteu reakcije (izrađeno u programu ChemDraw)

Pripremljene otopine galne kiseline se pipetiraju u jažice te se mjeri apsorbanacija na 750nm istim postupkom kao i za uzorke. Pripremi se i slijepa proba to jest otopina galne kiseline za mjerenje. Od dobivenih vrijednosti apsorbanacije galne kiseline različitih koncentracija ( $A$ ), oduzeta je apsorbanacija otopine galne kiseline ( $A_B$ ) te se ta razlika koristi za izradu baždarnog dijagrama, koji prikazuje njezinu ovisnost o miligramima galne kiseline po litri. (Slika 10.)



**Slika 10. Baždarni dijagram za određivanje ukupnog redukcijskog potencijala**

U mikrotitarsku pločicu od 96 jažica pipetira se po 20 $\mu$ l uzorka, svaki u triplikatu. Kao slijepa proba je korištena miliQ voda. Doda se 50  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagensa te se uzroci tresu 60 sekundi i inkubiraju na 37 °C 210 sekundi u uređaju. Zatim se u svaku jažicu doda 160  $\mu$ l pripremljene otopine natrijevog karbonata. Uzorci se tresu i inkubiraju na 37 °C 30 minuta u uređaju. Po isteku vremena, pročita se apsorbancija na 750nm.

### 3.2.8. Statistička obrada podataka

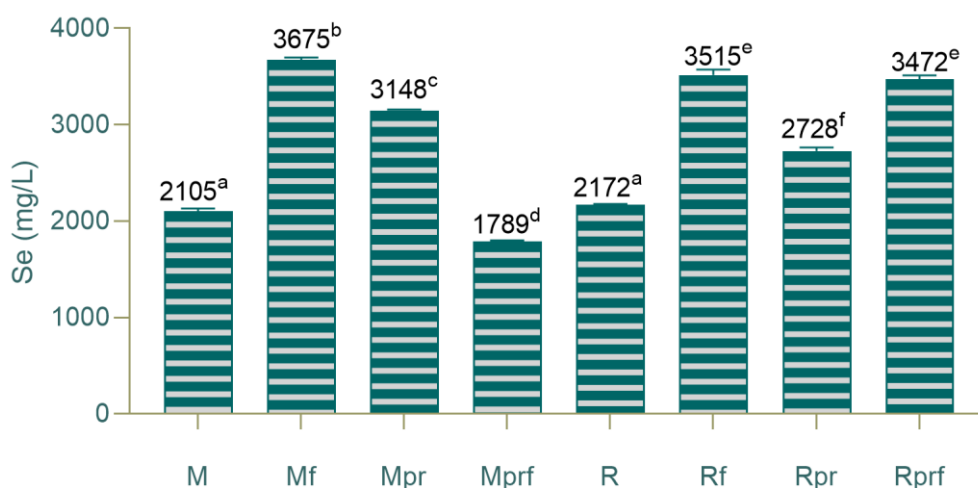
Podaci su statistički obrađeni korištenjem programskog paketa Microsoft Office Excel i GraphPad Prism 7.0. Za statističku obradu podataka korišteni su parametrijski testovi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ispitivanja provedenih u duplikatu ili triplikatu.  $\pm$  standardna devijacija. Značajnost je istraživana primjenom Studentovog t-testa ili jednosmjerne analize varijance uz primjenu pos hoc Bonferonijevog testa uz razinu značajnosti  $p < 0.05$ .

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. Iskorištenje postupka sinteze nanočestica selena

Količina elementarnog selena nastalog različitim postupcima sinteze određena je postupkom atomsko-apsorpcijske spektrometrije i prikazana na Slici 11.



**Slika 11.** Količina sintetiziranih nanočestica selena prije simulacije probave (mg/L)

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline. Stupići označeni istim slovom ne razlikuju se značajno ( $p > 0.05$ )

Iz grafa (Slika 11.) može se zaključiti da je veća prosječna količina Nanočestica selena u reakcijskim smjesama gdje je kao stabilizator korišten pektin iz komine rajčice (od onih kojima su nanočestice stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine). Prosječna količina nastalog selena iz M uzoraka je 2679,3 mg/L, a iz R uzoraka je 2971,8 mg/L.

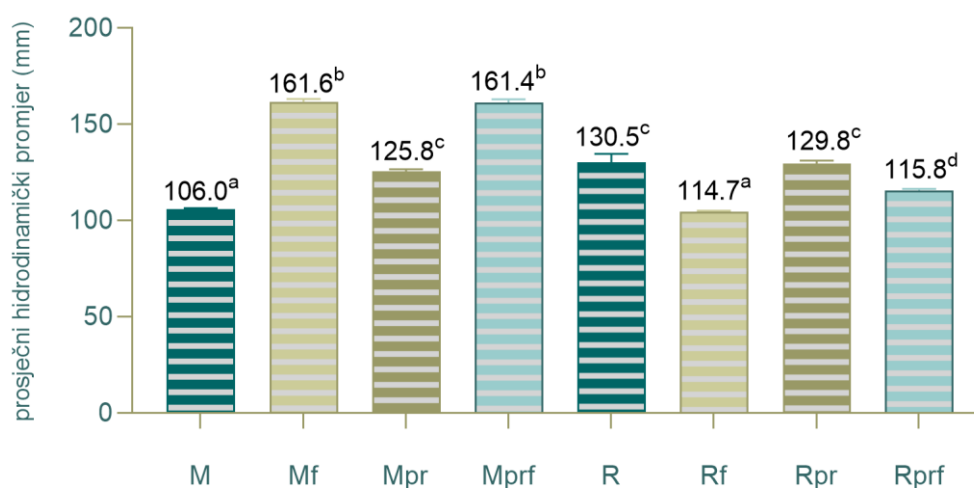
Rezultati ukazuju na povećanje prinosa reakcije sinteze nanočestica selena upotrebom pročišćenog pektina umjesto sirovog pektina. Kod Mpr uzorka u odnosu na M, vidljiv je porast

od 49,5 %, dok je za uzorak Rpr u odnosu na R vidljiv porast od 25,6 % Mogući uzrok tome je smanjenje interferencija u reakcijskoj smjesi što povećava prinos reakcije.

Također je primjetan pozitivan učinak funkcionalizacije primjenom ekstrakta komine masline. Najviše izmjerene vrijednosti su kod Mf, Rf i Rprf uzoraka. Dodatkom biljnih ekstrakata u reakcijsku smjesu povećava se redukcijaska sposobnost što rezultira učinkovitijom redukcijom selenita.

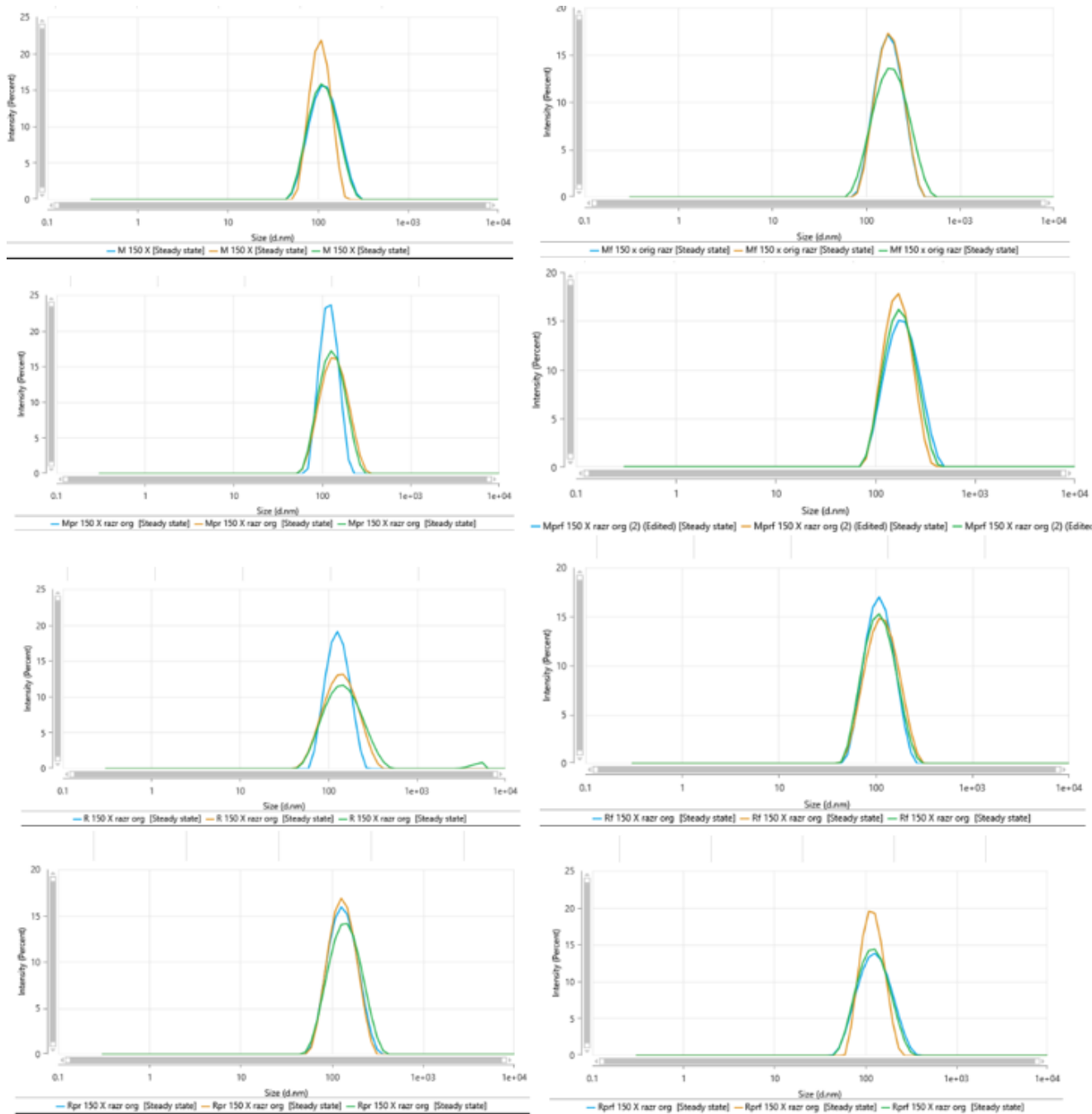
#### 4.1.2. Karakterizacija nanočestica seleno prije *in vitro* simulacije probave

##### 4.1.2.1. Raspodjela veličine nanočestica seleno



Slika 12. Prosječna veličina nanočestica seleno (hidrodinamički promjer) prije simulacije probave

**M** – nanočestice seleno stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice seleno stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice seleno stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice seleno stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice seleno stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice seleno stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice seleno stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice seleno stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline. Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )



**Slika 13. Raspodjela veličine nanočestica selena prije simulacije probave**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline



Raspodjela veličine čestica i srednji hidrodinamički promjer mjereni su DLS tehnikom kako je ranije opisano. Slika 12. prikazuje prosječnu veličinu čestica uzoraka. Iz slike je vidljivo da uzorci Mf i Mprf imaju najveći hidrodinamički promjer (161,6 i 161,4 dh/nm) što ukazuje na mogućnost nešto manje očekivane bioraspoloživosti. Prosječna veličina uzoraka stabiliziranih pektinima mandarine je 138 dh/nm, a uzoraka stabiliziranih pektinima komine rajčice 120 dh/nm. Najmanjima su se pokazali uzorci M i Rf kojima je promjer 106 i 106 (dh/nm) te se očekuje dobra bioraspoloživost istih. Slika 13. prikazuje homogenu i unimodalnu raspodjelu veličine svih uzoraka što znači da nema čestica koje veličinom odskaču od prosjeka te tako čine sustav nestabilnim. Prema tome može se očekivati dobra stabilnost svih uzoraka, osim Mf i Mprf, prije simulacije probave.

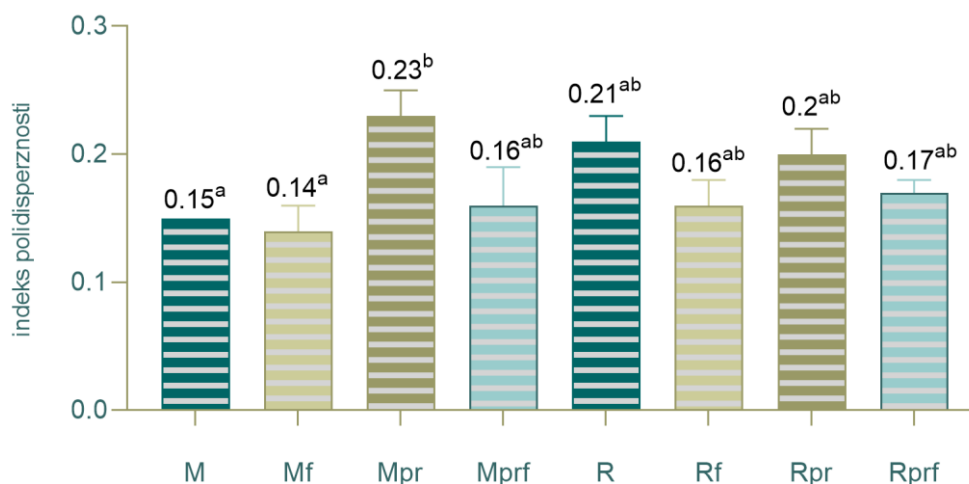
#### 4.1.2.2. *Indeks polidisperznosti nanočestica selena*

Indeks polidisperznosti označava mjeru heterogenosti veličine čestica nanosuspenzije. One nisu uniformne pa se govori o prosječnoj veličini. Polidisperznost je mjera heterogenosti veličine kapljica i proporcionalna je standardnoj devijaciji funkcije raspodjele veličine čestica (engl. droplet size distribution, DSD). Veća standardna devijacija ujedno znači i veći indeks polidisperznosti. Izračunava se iz standardne devijacije raspodjele veličine i prosječnog promjera prema formuli (Calderó i sur., 2016.).

$$PDI = ( \sigma / D_{50} )^2$$

PDI- indeks polidisperznosti,  $\sigma$  – standardna devijacija,  $D_{50}$ -srednja veličina čestica

Sustavi se smatraju monodisperznima ukoliko im je PDI manji od 0.2.

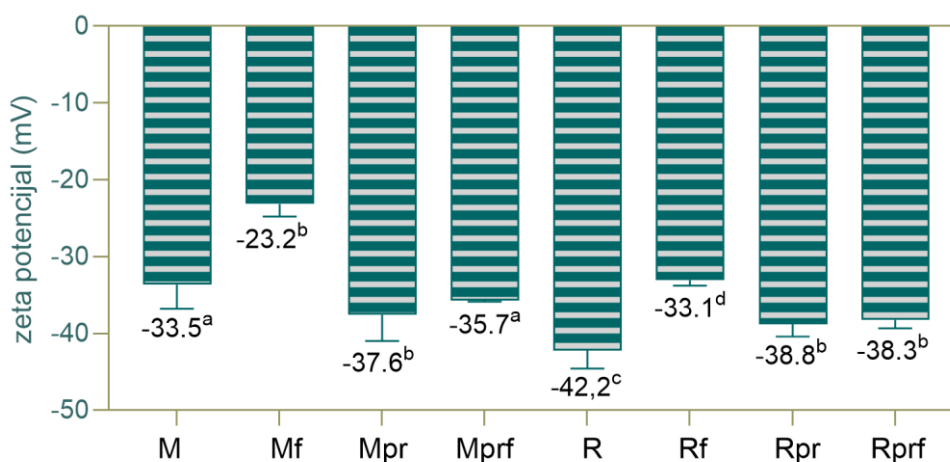


**Slika 14. Indeks polidisperznosti nanočestica selena prije simulacije probave**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline. Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

Svi uzorci osim Mpr i R su monodisperzni te iskazuju zadovoljavajuća svojstva. Izmjereni PDI uzorka Mpr je 0,23, a R 0,21. (Slika 14.)

#### 4.1.2.3. Zeta potencijal nanočestica selena

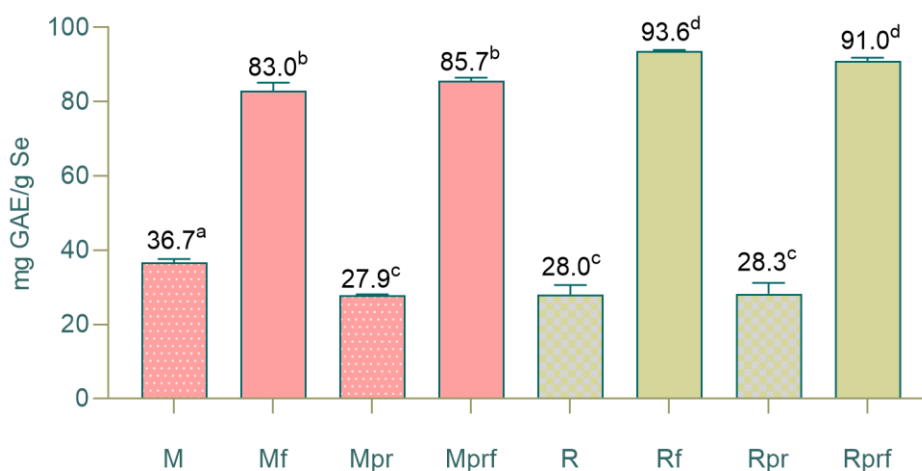


Slika 15. Zeta potencijal nanočestica selena prije simulacije probave

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline. Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

Zeta potencijal je izmjeren na Zetasizeru zajedno s raspodjelom veličine čestica ranije opisanom tehnikom. Svim uzorcima je izmjeren zeta potencijal negativniji od -30 mV, osim Mf kojem je prosječna vrijednost zeta potencijala iznosila -23,2 mV. (Slika 15.) To ukazuje na manju stabilnost uzorka i veću šansu da koagulira u suspenziji. Najveću apsolutnu negativnu vrijednost zeta potencijala imali su uzorci R, Rpr i Rprf koji su redom iznosili -42,23, -38,76 i -38,24 mV. Prosječna vrijednost M uzoraka je -32,51 mV, dok za R uzorke prosjek iznosi -38,08 mV.

#### 4.1.2.4. Ukupni reduksijski potencijal nanočestica selena



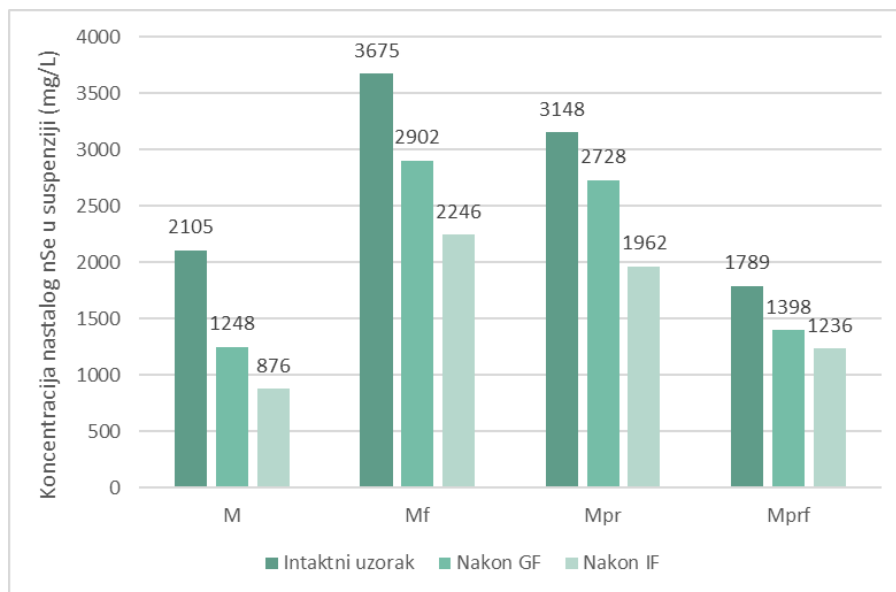
**Slika 16. Ukupni reduksijski potencijali nanočestica selena prije simulacije probave**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline. Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

Ukupni reduksijski potencijal mjereno je Folin-Ciocalteu metodom. Slika 16. prikazuje antioksidacijske potencijale uzoraka izražene kao ekvivalente GAE. Iz prikazanih podataka jasno je vidljiv utjecaj funkcionalizacije na vrijednost reduksijskog potencijala. Najveća je razlika uočena kod R uzoraka gdje je ukupni reduksijski potencijal R uzorka iznosio 28,0 mg GAE/Se (mg/100 mg), a Rf 93,6 (3.34 puta veći ukupni reduksijski potencijal). Rprf je imao 3.22 puta veći ukupni reduksijski potencijal. Nema statistički značajnih razlika između pročišćenih i ne-pročišćenih uzoraka – uočeno je 3%-tno povećanje reduksijskog potencijala kod Mprf-Mf te 1 % povećanje kod Rprf-Rf.

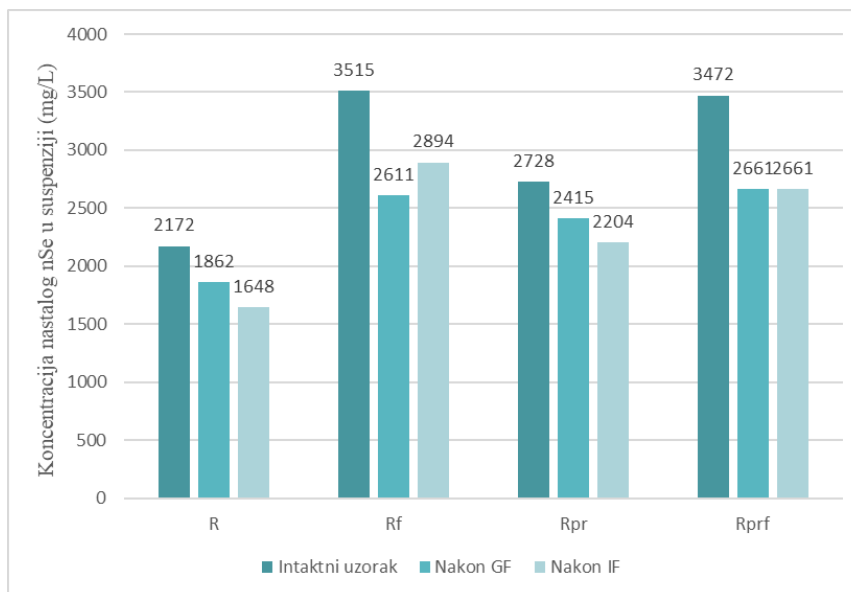
### 4.1.3. Karakterizacija nanočestica selena poslije *in vitro* simulacije probave

#### 4.1.3.1. Utjecaj simulacije probave na koncentraciju nanočestica selena



**Slika 17. Utjecaj simulacije probave na koncentracije nanočestica selena stabiliziranih pektinom kore mandarine**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza

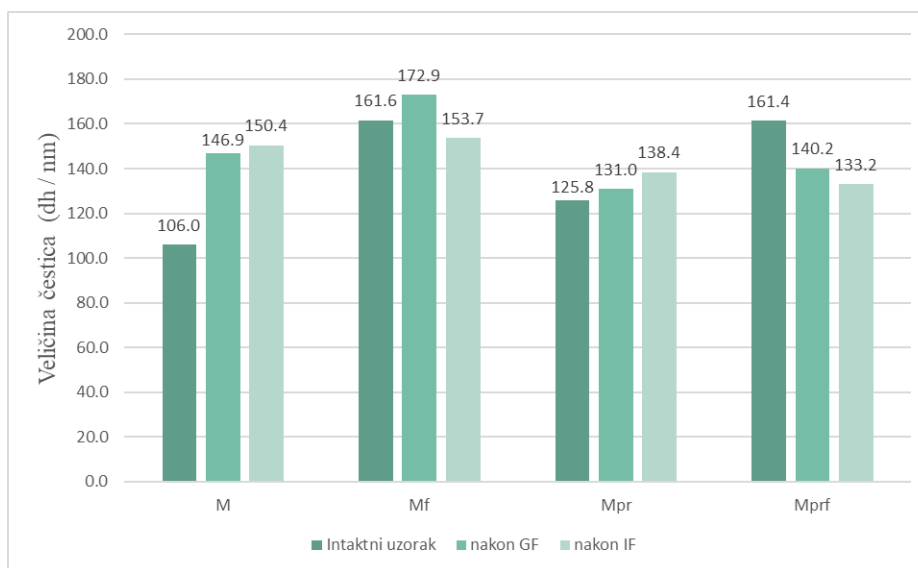


**Slika 18. Utjecaj simulacije probave na koncentracije nanočestica selena stabiliziranih pektinom komine rajčice**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza

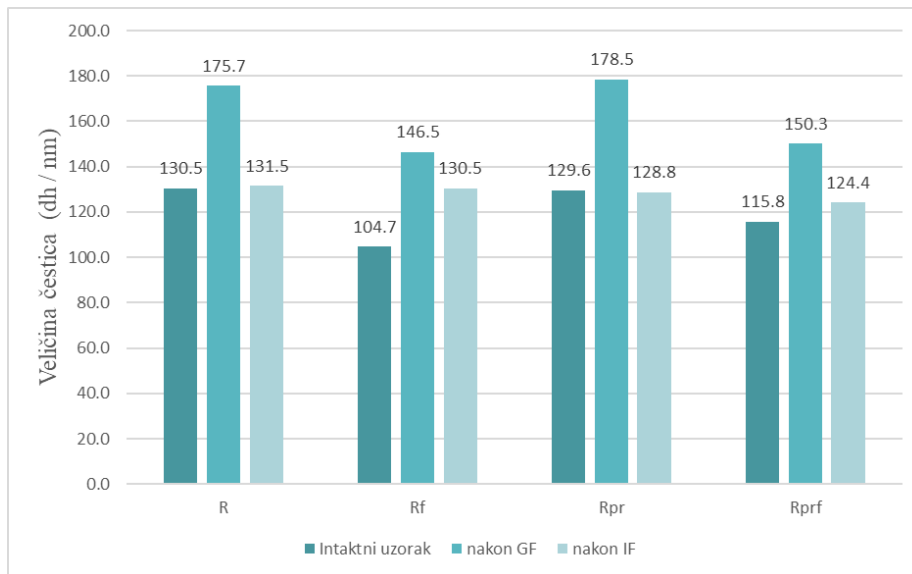
Mjerenjem apsorbancije reakcijskih smjesa na 405 nm određene su koncentracije nanočestica selena u uzorcima prije i poslije simulacije probave. (Slike 17. i 18.). Bez obzira na tip nanočestice, vidljivo je da se tijekom probave koncentracija nanočestica smanjuje. Najstabilnijima su se pokazale funkcionalizirane nanočestice kod obje skupine uzoraka što se može pripisati dodatnoj stabilizaciji koja se ostvaruje adsorpcijom antioksidansa na površinu nanočestica. Najnestabilnije su bile M nanočestice čija se koncentracija tijekom simulacije probave smanjila s 2015 na 876 mg/L. Najveća koncentracija nanočestica nakon simulacije probave izmjerena je kod Rf uzorka te je iznosila 2894 mg/L. Prosječna količina nastalih nanočestica selena iz R uzorka je 2570,3 mg/L, a kod M uzorka 2109,4 mg/L.

#### 4.1.3.2. Utjecaj simulacije probave na raspodjelu veličine nanočestica selena



**Slika 19. Utjecaj simulacije probave na veličinu nanočestica selena stabiliziranih pektinom kore mandarine**

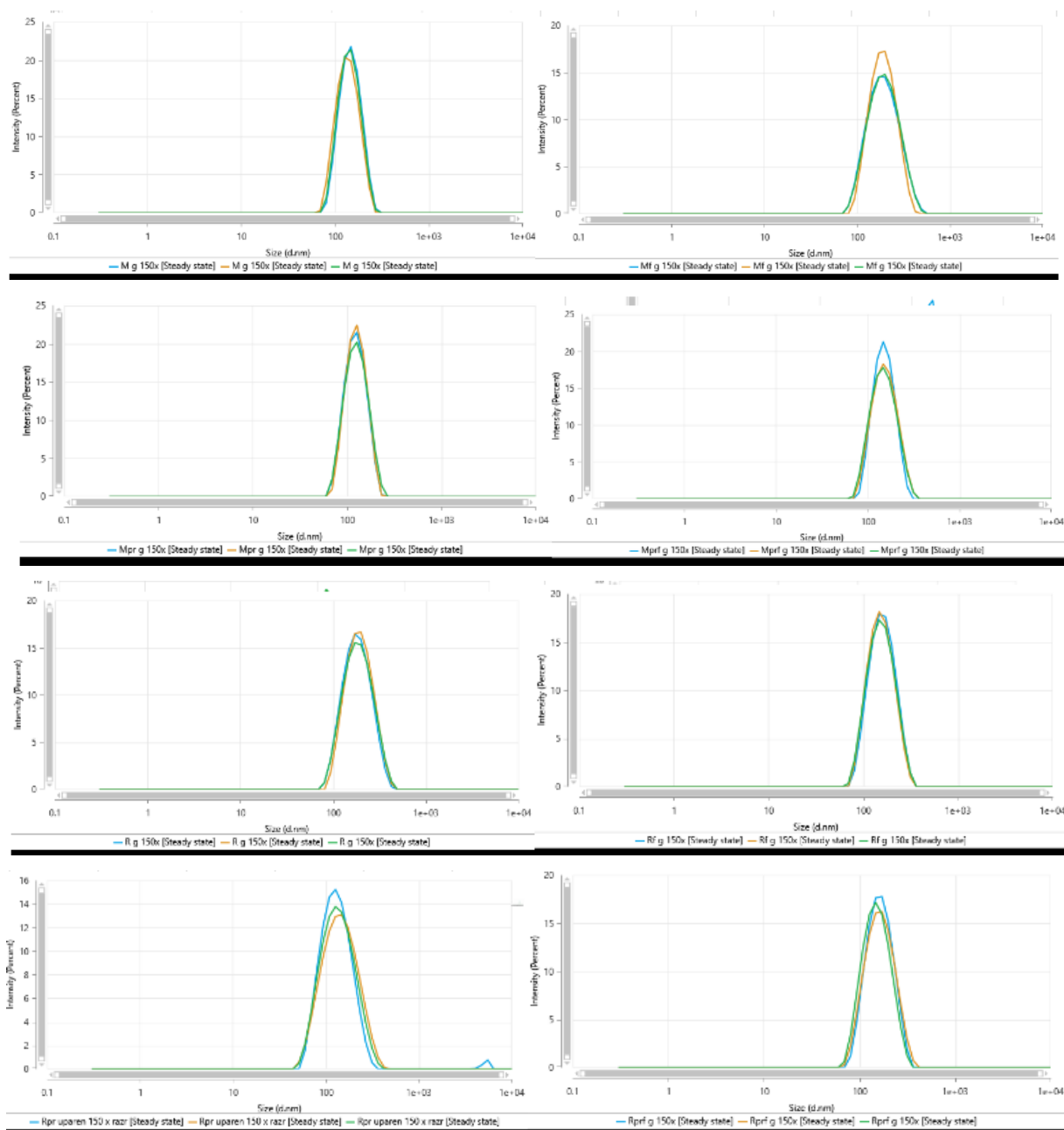
**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza



**Slika 20. Utjecaj simulacije probave na veličinu nanočestica selena stabiliziranih pektinom komine rajčice**

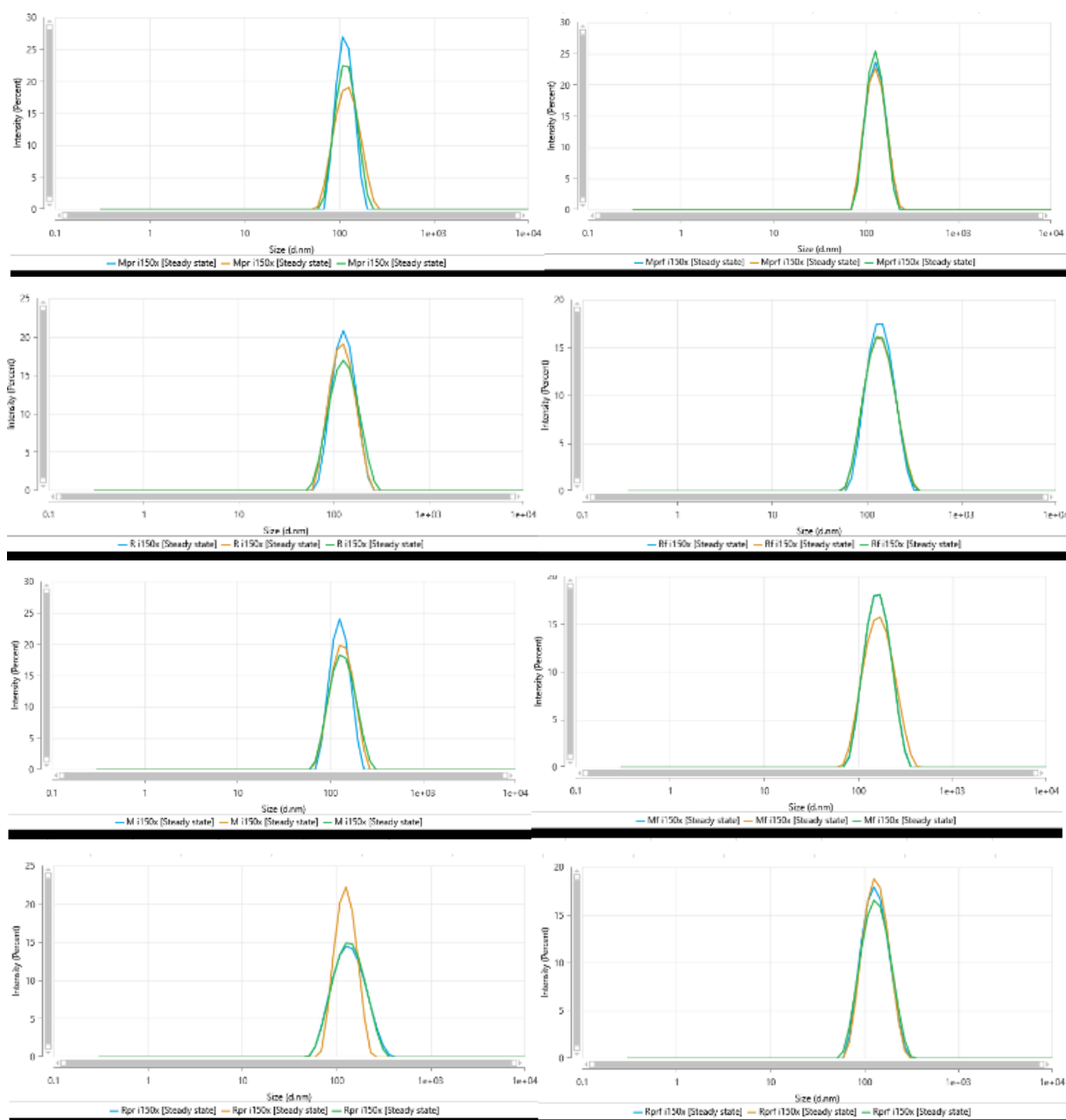
**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza





**Slika 21. Raspodjela veličine čestica nakon simulacije gastrične faze probave**

**Mg** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine nakon gastrične faze, **Mprg** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine nakon gastrične faze, **Mfg** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon gastrične faze, **Mprfg** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon gastrične faze, **Rg** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice nakon gastrične faze, **Rprg**- nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice nakon gastrične faze, **Rfg** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon gastrične faze, **Rprfg** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon gastrične faze



**Slika 22. Raspodjela veličine čestica nakon simulacije intestinalne faze probave**

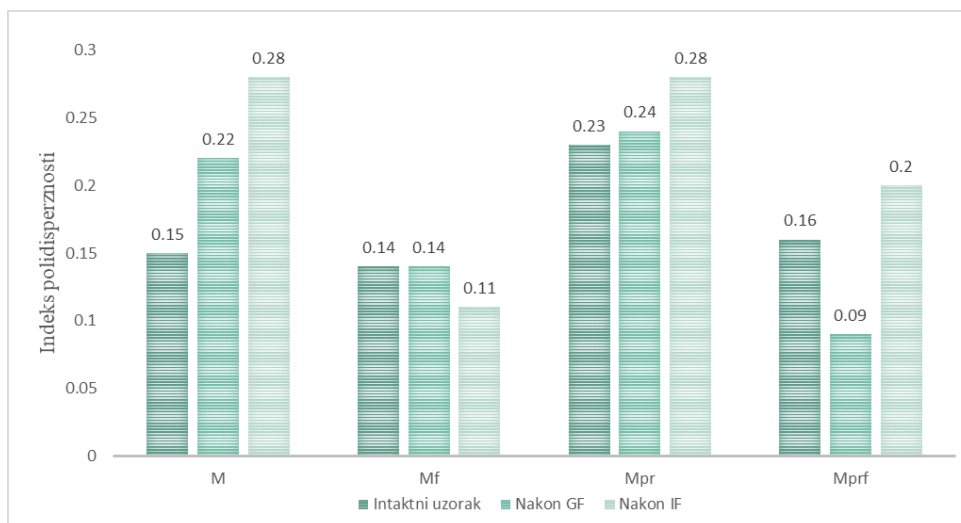
**Mi** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine nakon intestinalne faze, **Mpri** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine nakon intestinalne faze, **Mfi** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon intestinalne faze, **Mprfi** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon intestinalne faze, **Ri** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice nakon intestinalne faze, **Rpri** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice nakon intestinalne faze, **Rfi** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon intestinalne faze, **Rprfi** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline nakon intestinalne faze

Najmanji hidrodinamički promjer je izmjeren kod Rprf uzorka te je iznosio 128,7 dh/nm. Kod svih uzoraka stabiliziranih kominom rajčice došlo je do povećanja hidrodinamičkog promjera čestica u gastričnoj fazi te ponovnog smanjenja u intestinalnoj fazi. (Slika 20.) Kod Mprf uzorka koji je prije simulacije probave imao najveći hidrodinamički promjer (161,4 dh/nm) došlo je do smanjenja veličine nakon gastrične i intestinalne faze. (Slika 19.) M i Mf uzorci nakon simulacije probave imaju promjer veći od 150 dh/nm te oni imaju veću šansu agregacije u suspenziji. Prosječni promjer M uzorka nakon intestinalne faze je 143,9 dh/nm, R uzorka 128,8 dh/nm iz čega se može zaključiti da su uzorci stabilizirani pektinom iz koline rajčice stabilniji tijekom digestije.

Promjena raspodjele veličine čestica tijekom simulacije probave praćena je primjenom DLS metode, a dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 21. i 22.

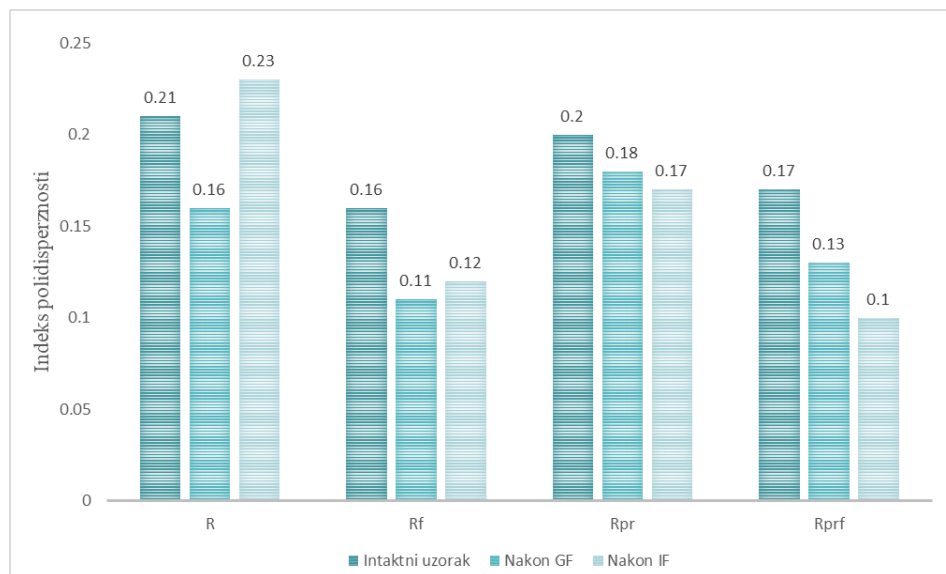
Iz Slika 21. i 22. može se zaključiti da je i nakon simulacije probave u otopinama prisutna unimodalna raspodjela veličina čestica kod svih uzoraka i nakon simulacije probave. Kod Rpr uzorka nakon intestinalne faze na Slici 20. vidi se heterogena raspodjela veličine čestica, jedno mjerenje je pokazalo veći hidrodinamički promjer od druga dva mjerenja.

#### 4.1.3.3. Utjecaj simulacije probave na indeks polidisperznosti nanočestica selena



**Slika 23. Utjecaj simulacije probave na indeks polidisperznosti nanočestica selena stabiliziranih pektinom kore mandarine**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza

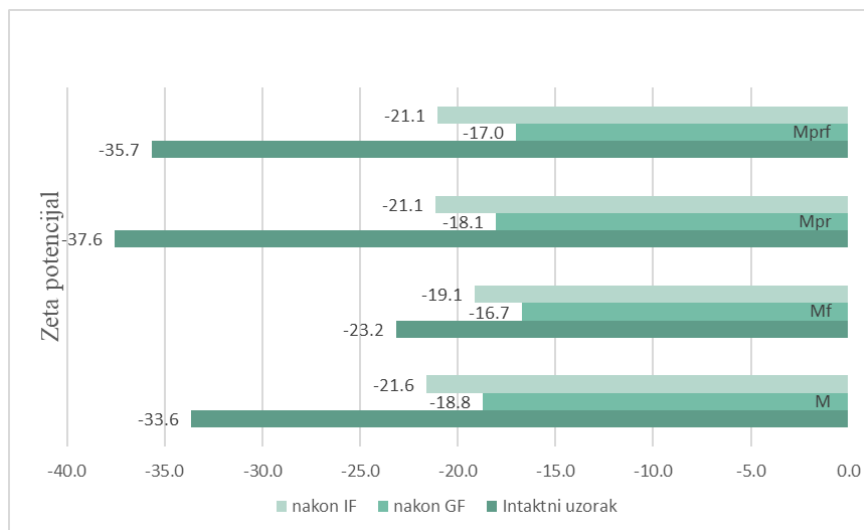


**Slika 24. Utjecaj simulacije probave na indeks polidisperznosti nanočestica selena stabiliziranih pektinom komine rajčice**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza

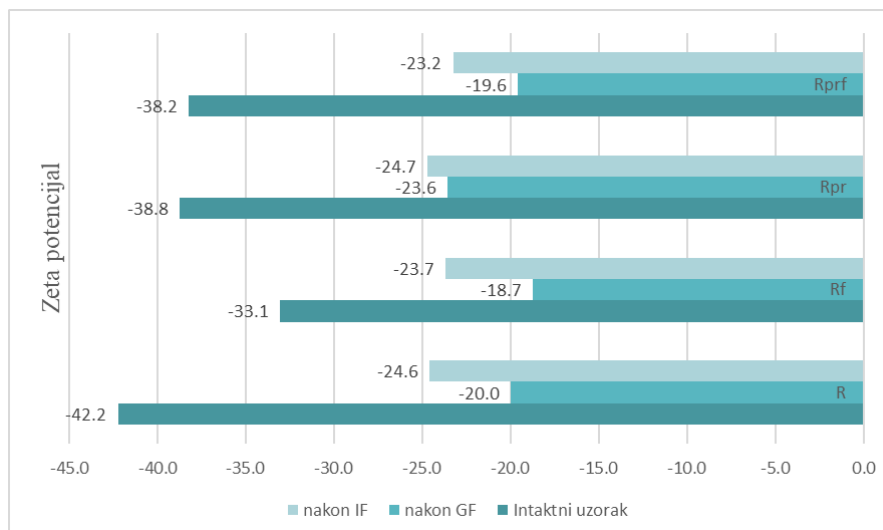
Utjecaj probave na indeks polidisperznosti bio je varijabilan i ovisio je o tipu nanočestice. U dijelu uzoraka zamijećeno je povećanje indeksa polidisperznosti što ukazuje na smanjenu uniformnost veličine čestica. Uzorcima u kojima je došlo do smanjenja indeksa polidisperznosti nakon simulacije probave je smanjena varijacija veličine čestica. Mogući uzrok tome je promjena pH i prisutnost drugih komponenata intestinalne tekućine koji su pridonijeli boljoj distribuciji raspodijele veličina. (Jia H. Shi i sur, 2020.) Iz Slika 23. i 24. se može zaključiti da funkcionalizirani uzorci u prosjeku imaju niži indeks polidisperznosti od standardnih uzoraka. Najniži indeks polidisperznosti imaju Mf i Rprf uzorci te iznosi 0,11 i 0,1. Iako svi uzorci osim M, Mpr i R imaju zadovoljavajući indeks polidisperznosti jer je niži od 0,2. Uzorci M i Mpr imaju najveći indeks polidisperznosti te se kod njih očekuje najmanja stabilnost i najlošija svojstva čestica. Ovdje se vidi utjecaj funkcionalizacije i pročišćavanja kod uzoraka stabiliziranih pektinima rajčice i mandarine. Oba uzorka stabilizirana sirovim nepročišćenim pektinima imaju značajno lošiji indeks polidisperznosti.

#### 4.1.3.4. Utjecaj simulacije probave na zeta potencijal nanočestica selena



**Slika 25. Zeta potencijal nanočestica selena stabiliziranih pektinom kore mandarine prije i nakon simulacije probave**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza

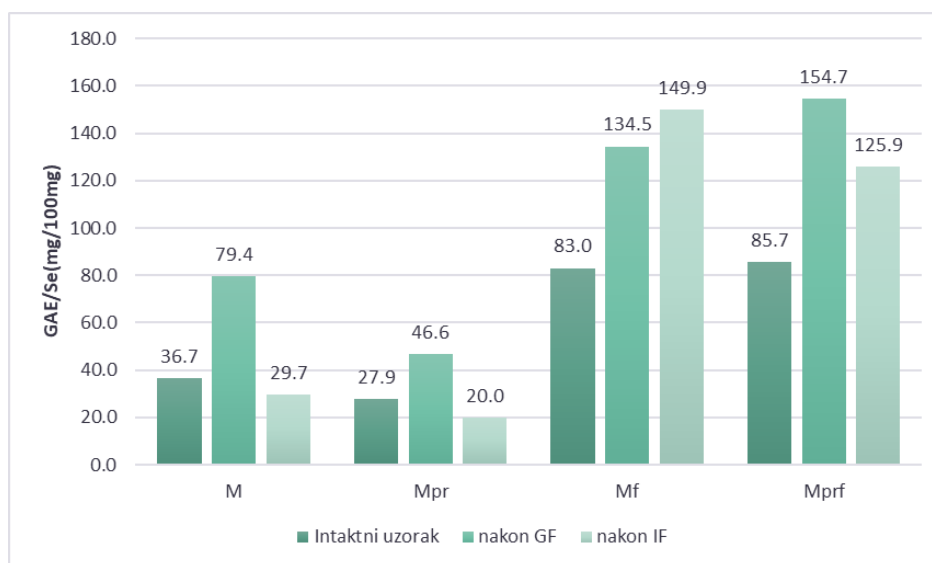


**Slika 26. Zeta potencijal nanočestica selena stabiliziranih pektinom komine rajčice prije i nakon simulacije probave**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza

Kod svih promatranih uzoraka je došlo do značajnog smanjenja zeta potencijala (Slika 25. i 26.) Najnegativniji zeta potencijal nakon intestinalne faze je izmjeren kod Rpr uzorka (-24,7 mV) te se kod njega očekuje veća stabilnost. Nisu utvrđene statistički značajne razlike statistički značajnih razlika između grupa uzoraka. Očekuje se ista stabilnost uzoraka stabiliziranih pektinom rajčice i mandarine.

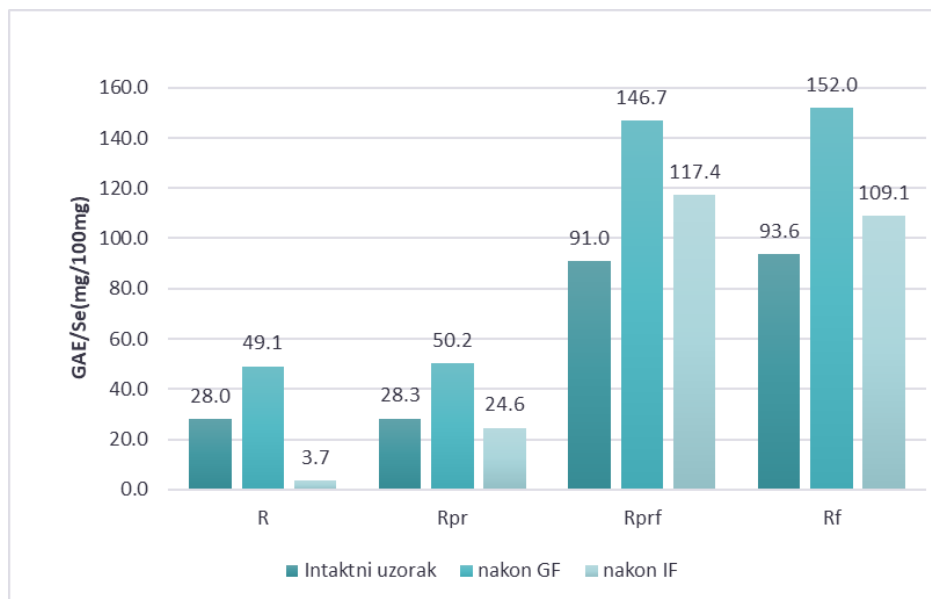
#### 4.1.3.5. Utjecaj simulacije probave na ukupni redukcijski potencijal nanočestica selena



**Slika 27. Utjecaj simulacije probave na ukupni redukcijski potencijal nanočestica selena stabiliziranih pektinom iz kore mandarine**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza





**Slika 28. Utjecaj simulacije probave na ukupni redukcijski potencijal nanočestica selena stabiliziranih pektinom iz kumine rajčice**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom kumine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom kumine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kumine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kumine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kumine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom kumine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kumine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom kumine masline, **GF**- gastrična faza, **IF**- intestinalna faza

Slike 27. i 28. pokazuju pozitivan učinak funkcionalizacije na ukupni redukcijski potencijal. Najviše vrijednosti su izmjerene kod Mf, Mprf, Rf i Rprf uzoraka nakon simulacije probave. Nakon intestinalne faze uzorak Mf je imao 5 puta veći ukupni redukcijski potencijal od M uzorka, a Mprf 6.3 puta veći od Mpr. Kod Rprf-Rpr izmjereno je povećanje od 4.8 puta. Najveći razmjernik je bio između R-Rf zbog jako niske vrijednosti ukupnog redukcijskog potencijala R uzorka koji je iznosio 3,7 mg GAE/Se (mg/100 mg). Mogući uzrok tome je degradacija fenolnih komponenti u manje aktivne oblike u blago alkalnom pH. (Lou i sur., 2022.)

## **4.2. Rasprava**

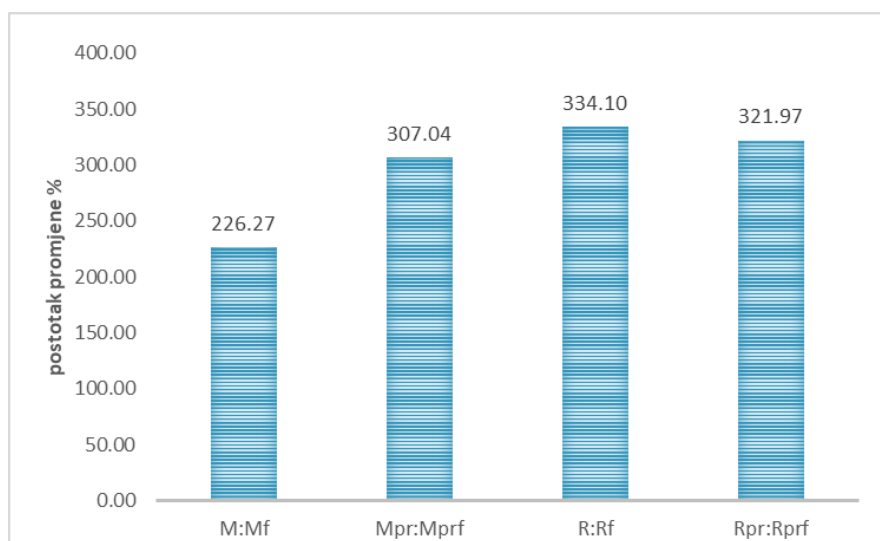
### **4.2.1. Mogućnosti primjene pektina iz kome rajčice/kore mandarine kao stabilizacijskih sredstava u sintezi selenovih nanočestica**

U ovom istraživanju istražene su mogućnosti korištenja pektina izoliranih iz sekundarnih sirovina kome rajčice i kore mandarine kao sredstava za stabilizaciju nanočestica selena te je pokazano da se njihovom primjenom mogu dobiti nanosustavi zadovoljavajućih funkcionalnih karakteristika što je u skladu s prethodnim istraživanjima drugih autora, Pektini su korišteni za sintezu i stabilizaciju različitih metalnih i metal-oksidnih nanočestica zbog njihove sposobnosti adsorpcije na metalne ione i sprječavanja aglomeracije nanočestica, a mogu pružiti biokompatibilan premaz, što je posebno važno za biomedicinske primjene. U istraživanju Kediri i sur., (2022.) pektini su se pokazali kao učinkovita sredstva inkapsulacije nanočestica i poboljšali su biodostupnost i stabilnost lijekova. U našem istraživanju pektini iz kome rajčice su se pokazali kao bolje stabilizacijsko sredstvo jer je došlo do formiranja nanočestica selena boljih funkcionalnih svojstava (manji hidrodinamički promjer, niži indeks polidisperznosti i niži zeta potencijal).

### **4.2.2. Utjecaj funkcionalizacije površine selenovih nanočestica na antioksidacijski potencijal nanočestica i stabilnost tijekom probave**

Antioksidativna svojstva selena su glavni razlog njegove primjene u biomedicinskom području. Upravo se antioksidativno djelovanje Se, koje je uvjetovano njegovom ugradnjom u selenoproteine i doprinosom endogenom sustavu borbe protiv oksidacijskog stresa, može pojačati površinskom modifikacijom nanočesticama spojevima koji imaju direktni redukcijски učinak (čime se ostvaruje sinergistički učinak). U okviru ovog rada istraženo je utječe li vrsta odnosno stupanj pročišćenosti pektina na mogućnost adsorpcije polifenola na površinu nanočestice te je utvrđeno da je uklanjanjem interferencija pročišćavanjem pektina moguće je dobiti čestice s izraženijim antioksidativnim svojstvima. Iz tog razloga očekivan je porast

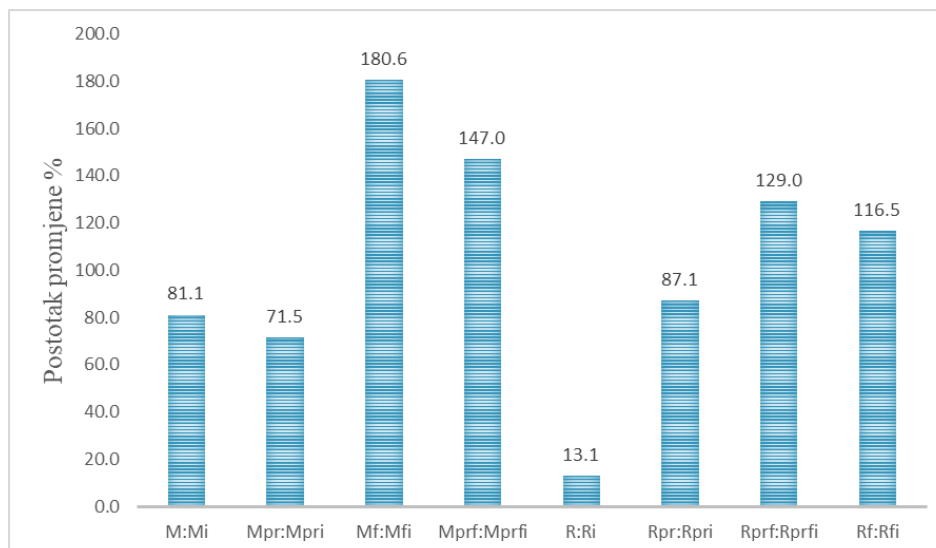
redukcijskog potencijala kod pročišćenih i funkcionaliziranih uzoraka. Slika 29. pokazuje koliko je značajan utjecaj funkcionalizacije na antioksidacijska svojstva nanočestica selena.



**Slika 29. Utjecaj funkcionalizacije površine nanočestica selena polifenolima masline na ukupni redukcijski potencijal**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline

Nadalje, na Slici 30. vidljivo je da nakon intestinalne faze probave svi funkcionalizirani uzorci pokazuju značajno više vrijednosti redukcijskog potencijala. Za razliku od njih, nefunkcionalizirani uzorci nakon simulacije procesa probave pokazuju niži antioksidacijski potencijal.



**Slika 30. Utjecaj simulacije probave na ukupni redukcijski potencijal nanočestica selena**

**M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine, **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine, **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice, **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice, **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline, **IF**- intestinalna faza

Kod gotovo svih uzoraka vidljiv je porast ukupnog redukcijskog potencijala nakon gastične faze i smanjenje nakon intestinalne faze. (Slika 27. i 28.) Porast antioksidativne aktivnosti nanočestica selena nakon gastične faze može se objasniti otpuštanjem i transformacijom polifenolnih komponenti tijekom simulacije probave. Studije su već pokazale da se antioksidativna sposobnost često značajno poveća nakon gastične faze zbog kiselog medija. Takav okoliš pospješuje otpuštanje i transformaciju polifenola i drugih antioksidativnih komponenti. No, ova aktivnost se može smanjiti tijekom intestinalne faze zbog neutralnog ili blago alkalnog pH, što dovodi do razgradnje antioksidativnih komponenti u manje aktivne oblike. (Lou i sur., 2022.) Stoga su rezultati dobiveni u ovom istraživanju, a koji se tiču utjecaja probave na antioksidativnu sposobnost nanosustava, u skladu s podacima drugih autora.

#### **4.2.3. Utjecaj funkcionalizacije površine selenovih nanočestica na veličinu i zeta potencijal nanočestica i stabilnost tijekom probave**

Mjerenjem raspodjele veličine čestica prije i nakon in vitro simulacije probave moguće je pretpostaviti bioraspoloživost i stabilnost čestica. Dobra bioraspoloživost se povezuje s nanočesticama veličine do 200 nm i to zbog njihove poboljšane sposobnosti kretanja kroz mukozni sloj i prodiranja u crijevni epitel. Na primjer, čvrste lipidne nanočestice pokazale su trostruko povećanje oralne bioraspoloživosti retinoične kiseline kada je veličina čestica smanjena s 328,8 nm na 89,3 nm. Također, manje nanočestice pokazuju bolju bioadhezivnost što produljuje njihovo vrijeme zadržavanja i povećava oralnu bioraspoloživost. (Wang i sur, 2020).

Iz rezultata ovog istraživanja (Slika 21. i Slika 22.) vidljivo je da je hidrodinamički promjer svih uzoraka prije i nakon simulacije probave manji od 200 nm što ukazuje na potencijalno zadovoljavajuću bioraspoloživost. Pri tome dodatno treba uzeti u obzir da vrijednost izmjerenog hidrodinamičkog promjera uključuje i vodeni hidratacijski sloj oko čestice te je njezina stvarna veličina zapravo manja od izmjerene. Naime, hidrodinamički promjer može povećati promjer nanočestice, ovisno o otapalu, 25-50 %. (Lou i sur., 2022.) Prije simulacije procesa probave najveći hidrodinamički promjer izmjeren je kod Mf i Mprf uzoraka (veći od 160 nm). Mogući uzrok povećanog hidrodinamičkog promjera i agregacije kod Mf i Mprf uzoraka je prisutnost više funkcionalnih skupina koje su reagirale s drugim nanočesticama te tako značajno povećale promjer. (Lou i sur., 2022.) Kod svih uzoraka stabiliziranih kominom rajčice došlo je do povećanja hidrodinamičkog promjera čestica tijekom gastrične faze probave te ponovnog smanjenja tijekom intestinalne faze. Mogući uzrok je reagiranje ionskih skupina pektina s ionima u otopini te nižem pH u gastričnoj fazi pri čemu dolazi do agregacije čestica. Pri ponovnom povišenju pH došlo je do deagregacije čestica te smanjenja hidrodinamičkog promjera. (Jia H. Shi i sur, 2020.) Nakon provedene intestinalne faze probave samo kod M i Mf uzoraka ne dolazi do naknadne deagregacije i smanjenja hidrodinamičkog promjera.

Zeta potencijalom se također ispituje stabilnost čestica i njihova svojstva u otopini. Ako čestice imaju negativniji potencijal od -30 mV smatraju se stabilnima te je manja šansa da će doći do koagulacije. Svi uzorci, osim Mf, prije simulacije probave imaju zeta potencijal negativniji od 30 mV. Od tih uzoraka se može očekivati dobra stabilnost u suspenziji. Moguće objašnjenje za smanjenje zeta potencijala je prisutnost funkcionalnih skupina koje mogu reagirati s ionima u okolnom mediju i tako smanjiti površinski naboj čestica. (Nawaz i sur., 2023.) Očekuje se bolja

stabilnost uzoraka stabiliziranih kominom rajčice zbog niže prosječne vrijednosti zeta potencijala.

Nakon simulacije probave svim uzorcima se smanjuje zeta potencijal na -20 mV što znači da probava ima negativan utjecaj na stabilnost sustava. Najlošija stabilnost je kod Mpr, Mprf i R uzoraka kod kojih je vrijednost zeta potencijala smanjena gotovo za 50%. Nema značajnih razlika između različitih vrsta pektina nakon simulacije probave, što znači da sami pektini ne stabiliziraju nanočestice dovoljno tijekom procesa probave.

## 5. Zaključci

Sirovi i pročišćeni pektini ekstrahirani iz kore mandarine i komine rajčice mogu se uspješno primijeniti u sintezi nanočestica selena

Pektini različitog stupnja čistoće (sirovi i pročišćeni) te iz različitih izvora (kora mandarine i komina rajčice) rezultiraju nastankom stabilnih nanosustava različitih fizikalno-kemijskih svojstava

Ekstrakt komine masline bogat polifenolima može se uspješno primijeniti za funkcionalizaciju površine nanočestica selena stabiliziranih pektinima kore mandarine/komine rajčice čime se mijenjaju inicijalna svojstva nanosustava

Sve sintetizirane nanočestice selena karakterizira monodisperzna i unimodalna raspodjela veličine, srednji hidrodinamički promjer adekvatan za *per os* primjenu (<200 nm) i zadovoljavajući zeta potencijal (> 30 mV)

Stupanj pročišćenosti pektina i funkcionalizacija površine polifenolima masline različito utječu na veličinu i zeta potencijal nanočestica selena, ovisno o vrsti korištenog pektina

Funkcionalizirane nanočestice selena stabilizirane pektinom kore mandarine imale su značajno veći hidrodinamički promjer i značajno manju apsolutnu vrijednost zeta potencijala od ostalih nanočestica selena što moguće ukazuje na manju stabilnost

Funkcionalizacija nanočestica selena polifenolima masline, bez obzira na tip pektina korišten u sintezi, značajno povećava redukcijski potencijal nanosustava (u prosjeku 5 puta).

Probava značajno smanjuje apsolutnu vrijednost zeta potencijala svih analiziranih uzoraka (što ukazuje na moguće smanjenje stabilnosti sustava), dok je utjecaj na srednji hidrodinamički promjer i indeks polidisperznosti varijabilan. Opažene promjene ne ukazuju na značajnu promjenu stabilnosti promatranog nanosustava.

Tijekom probave redukcijski potencijal funkcionaliziranih nanočestica selena raste, dok se, inicijalno značajno niži redukcijski potencijal nefunkcionaliziranih nanočestica, dodatno smanjuje.

Uzorci stabilizirani pektinom kome rajčice pokazuju bolju gastrointestinalnu stabilnost od uzoraka stabiliziranih pektinom iz kore mandarine (veću apsolutnu vrijednost zeta potencijala, manji hidrodinamički promjer i manji indeks polidisperznosti)



## 6. Popis kratica, oznaka i simbola

### Popis kratica:

- **ABTS** - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat
- **AML**- *acute myeloid leukemia*
- **DIO**- *Iodothyronine deiodinase*
- **DLS**-*Dynamic light scattering*
- **DNK**- Deoksiribonukleinska kiselina
- **DSD**- droplet size distribution
- **EKM**-polifenolni ekstrakt komine masline
- **FA-SeNP**- *Se-NP functionalized folic acid*
- **GAE**- *gallic acid equivalent*
- **GPX**- *glutathion peroxidase*
- **HPLC**- *High-Performance Liquid Chromatography*
- **INFOGEST**- *International Network of Excellence on the Fate of Food in the Gastrointestinal Tract*
- **M** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine
- **Mf** – nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline
- **Mpr** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine
- **Mprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kore mandarine i funkcionalizirane ekstraktom komine masline
- **MSRB1**- *Methionine-R-Sulfoxide Reductase B1*
- **NMR**- *Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*
- **PVP**-polivinil-pirolidon
- **R** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice
- **Rf** - nanočestice selena stabilizirane sirovim pektinom iz komine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom komine masline
- **RNS**- *Reactive nitrogen species*

- **ROS**- *Reactive oxygen species*
- **Rpr** - nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kumine rajčice
- **Rprf** – nanočestice selena stabilizirane pročišćenim pektinom iz kumine rajčice i funkcionalizirane ekstraktom kumine masline
- **SEM**-*Scanning electron microscope*
- **SGF** – *Simulated gastric fluid*
- **SIF** – *Simulated intestinal fluid*
- **SP**- *selenium polysaccharides*
- **SPS2**- *Selenophosphate synthetase*
- **TEM**-*Transmission electron microscope*
- **TXNRD**- *Thioredoxin reductase*
- **XRT**- *X-ray diffraction*

## 7. Literatura

Ahmad, F., Salem-Bekhit, M.M., Khan, F., Alshehri, S., Khan, A., Ghoneim, M.M., Wu, H.-F., Taha, E.I. i Elbagory, I., 2022. Unique Properties of Surface-Functionalized Nanoparticles for Bio-Application: Functionalization Mechanisms and Importance in Application. *Nanomaterials*, 12(8), str. 1333. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/8/1333> [Pristupljeno 26. srpnja 2024.].

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

Altammar KA. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front Microbiol*, 2023, 14, 1155622. doi: 10.3389/fmicb.2023.1155622.

Andersen, L.M.S., Hughes, D.A. i Calder, P.C., 2018. Selen i selenoproteini u upali crijeva—pregled. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 21(6), str. 490-495.

Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients*, 2018, 10(9), 1203. doi: 10.3390/nu10091203.

Beatty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, The Perkin - Elmer Corporation, 1993. Str. 1-1 – 1-6; 2-1 – 2-9.

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. i Recio, I., 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14, str. 991–1014.

Calderó G, Montes R, Llinàs M, García-Celma MJ, Porrás M, Solans C. Studies on the formation of polymeric nano-emulsions obtained via low-energy emulsification and their use as templates for drug delivery nanoparticle dispersions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 145, 922-931.

Chandel V, Biswas D, Roy S, Vaidya D, Verma A, Gupta A. Current Advancements in Pectin: Extraction, Properties and Multifunctional Applications. *Foods*, 2022, 11(17), 2683. doi: 10.3390/foods11172683.

Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*, 2011, 697, 63-70. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1\_6.

Coimbra MA, Cardoso SM, Lopes-da-Silva JA. Olive Pomace, a Source for Valuable Arabinan-Rich Pectic Polysaccharides. *Carbohydr Sustain Dev I*, 2010, 129-141. doi: 10.1007/128\_2010\_60.

Constantinescu-Aruxandei D, Frîncu RM, Capră L, Oancea F. Selenium Analysis and Speciation in Dietary Supplements Based on Next-Generation Selenium Ingredients. *Nutrients*, 2018, 10(10), 1381. doi: 10.3390/nu10101381.

Dranca F, Oroian M. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Res Int*, 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.065.

Dreaden, E.C., Austin, L.A., Mackey, M.A. i El-Sayed, M.A. (2012) 'Veličina je bitna: zlatne nanočestice u ciljanoj dostavi lijekova za rak', \*Chemical Society Reviews\*, 41(7), str. 2740-2779. doi: 10.1039/C1CS15237H.

Ferrari L, Cattaneo D, Abbate R, Manoni M, Ottoboni M, Luciano A, von Holst C, Pinotti L. Advances in selenium supplementation: From selenium-enriched yeast to potential selenium-enriched insects, and selenium nanoparticles. *Anim Nutr*, 2023, 14, 193-203. doi: 10.1016/j.aninu.2023.05.002.

Finley JW. Bioavailability of selenium from foods. *Nutr Rev*, 2006, 64, 146-151. doi: 10.1111/j.1753-4887.2006.tb00198.x.

Freitas CMP, Coimbra JSR, Souza VGL, Sousa RCS. Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings*, 2021, 11, 922. doi: 10.3390/coatings11080922.

Hackley VA, Clogston JD. Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. *NIST Spec Publ*, 2016, 1200-6. doi: 10.6028/NIST.SP.1200-6.

INFOGEST (2023) *International network of excellence on the fate of food in the gastrointestinal tract*. Dostupno na: <https://www.cost-infogest.eu/> (Pristupljeno: 20. travnja 2024.).

Karthik KK, Cheriyan BV, Rajeshkumar S, Gopalakrishnan M. A review on selenium nanoparticles and their biomedical applications. *Biomed Technol*, 2024, 61-74.

Kedir, W. M., Deresa, E. M. i Diriba, T. F., 2022. Pharmaceutical and drug delivery applications of pectin and its modified nanocomposites. *Heliyon*, 8(9), e10654. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10654.

Luo X, Tian M, Cheng Y, Ji C, Hu S, Liu H, Lu J, Ren J. Effects of simulated in vitro gastrointestinal digestion on antioxidant activities and potential bioaccessibility of phenolic compounds from *K. coccinea* fruits. *Front Nutr*, 2022, 9, 1024651. doi: 10.3389/fnut.2022.1024651.

Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles- a review. *Trop J Pharm Res*, 2006, 5(1), 561-573.

Murugesan G, Nagaraj K, Sunmathi D, Subramani K. Methods involved in the synthesis of selenium nanoparticles and their different applications. *Eur J Biomed Pharm Sci*, 2019, 6, 189-194.

Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1), 385. doi: 10.3390/ijms22010385.

Nawaz A, Irshad S, Walayat N, Khan MR, Iqbal MW, Luo X. Fabrication and Characterization of Apple-Pectin–PVA-Based Nanofibers for Improved Viability of Probiotics. *Foods*. 2023; 12(17):3194. <https://doi.org/10.3390/foods12173194>

Rai, M., Yadav, A. i Gade, A. (2009) 'Srebrne nanočestice kao nova generacija antimikrobnih sredstava', *\*Biotechnology Advances\**, 27(1), str. 76-83. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.

Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*, 2012, 379(9822), 1256-1268. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61452-9.

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

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 2000, 57, 929-967.

Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2021, 397(10284), 1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.

Shi JH, Axson JL, Bergin IL, Ault AP. Nanoparticle Digestion Simulator Reveals pH-Dependent Aggregation in the Gastrointestinal Tract. *ACS Publ*, 2020. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01844.s001.

Skoog, D.A., Holler, F.J. i Crouch, S.R. (2006). \*Principles of Instrumental Analysis\*. 6. izd. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole.

Sun Y, Wang Z, Gong P, Yao W, Ba Q, Wang H. Review on the health-promoting effect of adequate selenium status. *Front Nutr*, 2023, 10, 1136458. doi: 10.3389/fnut.2023.1136458.

Vahdati M, Tohidi Moghadam T. Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles-Lysozyme Nanohybrid System with Synergistic Antibacterial Properties. *Sci Rep*, 2020, 10, 510. doi: 10.1038/s41598-019-57333-7.

Van der Reijden, L., Zimmermann, G.M. i Arentson-Lantz, M.A., 2015. Selenium and Thyroid Function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.

Vinceti M, Filippini T, Del Giovane C, Dennert G, Zwahlen M, Brinkman M, Zeegers MPA, Horneber M, D'Amico R, Crespi CM. Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018(1), CD005195. doi: 10.1002/14651858.CD005195.pub4.

Wang N, Tan HY, Li S, Xu Y, Guo W, Feng Y. Supplementation of Micronutrient Selenium in Metabolic Diseases: Its Role as an Antioxidant. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 7478523. doi: 10.1155/2017/7478523.

Wang, Y., Pi, C., Feng, X., Hou, Y., Zhao, L. i Wei, Y., 2020. The Influence of Nanoparticle Properties on Oral Bioavailability of Drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 15, str. 6295-6310. Dostupno na: <https://doi.org/10.2147/IJN.S257269> [Pristupljeno 6. kolovoza 2024.].

Yang X, Zhang W, Zhao Z, Li N, Mou Z, Sun D, Cai Y, Wang W, Lin Y. Quercetin loading CdSe/ZnS nanoparticles as efficient antibacterial and anticancer materials. *J Inorg Biochem*, 2017, 167, 36-48.

## 8. Sažetak/Summary

### 8.1. Sažetak

Razvoj novih oblika nutraceutika za per os primjenu korištenjem zelenih i održivih formulacijskih pristupa koji se uklapaju u načela kružne ekonomije vrlo je dinamično i aktualno područje istraživanja.

U ovom radu istražene su mogućnosti zelene sinteze nanočestica. Se korištenjem pomoćnih tvari koje je moguće jednostavnim i zelenim postupcima izolirati iz prehrambenog otpada te je provedena funkcionalna karakterizacija dobivenih nanosustava s posebnim naglaskom na gastrointestinalnu stabilnost. U postupku sinteze kao stabilizacijska sredstva korišteni su pektini različitog stupnja čistoće (sirovi i pročišćeni) te iz različitih izvora (kora mandarine i komina rajčice), a u svrhu dodatne funkcionalizacije površine nastalih nanosustava korišten je ekstrakt komine masline bogat polifenolima. Svojstva nanočestica prije i nakon in vitro simulacije probave karakterizirana su određivanjem raspodjele veličine čestica, zeta potencijala, indeksa polidisperznosti te ukupnog redukcijskog potencijala.

Predloženi zeleni postupci sinteze nanočestica rezultirali su nastankom stabilnih nanosustava odgovarajućih fizikalno-kemijskih svojstava. Polifenoli masline uspješno su primijenjeni za funkcionalizaciju površine nanočestica selena te su značajno povećali redukcijski potencijal sustava. Tijekom probave dolazi do promjena fizikalno-kemijskih karakteristika nanosustava, međutim sve istražene nanočestice ostaju stabilne i primjenjive za per os primjenu.

Dobiveni rezultati pridonijet će trenutnim saznanjima o mogućnostima održivih postupaka formulacije visokovrijednih oblika selena za peroralnu primjenu poboljšanih biofarmaceutskih svojstava.



## 8.2. Summary

Development of innovative nutraceuticals for oral administration by using green and sustainable formulation approaches that fit into the principles of the circular economy is particularly dynamic and contemporary area of research.

This research investigated the possibilities of green synthesis of Se nanoparticles using excipients that can be isolated from food waste by applying simple and green procedures. Functional characterization of the obtained nanosystems was carried out with special emphasis put on the investigation of on gastrointestinal stability. In the synthesis process pectins of different degrees of purity (raw and purified) and from different sources (tangerine peel and tomato pomace) were used as stabilizing agents, and for the purpose of additional functionalization of the surface of the resulting nanosystems, olive pomace extract rich in polyphenols was used. The properties of nanoparticles before and after in vitro digestion simulation were characterized by determining the particle size distribution, zeta potential, polydispersity index and total reduction potential.

The proposed green synthesis procedure resulted in the creation of stable selenium nanosystems with appropriate physicochemical properties. Olive waste derived polyphenols were successfully applied to functionalize the surface of selenium nanoparticles and significantly increase the reduction potential of obtained nanoparticles. Even though digestion process altered particular physicochemical characteristics of the investigated nanosystems, all investigated nanoparticles remained stable and applicable for per os application.

Obtained results will contribute to current knowledge about the possibilities of sustainable formulations of innovative per os selenium formulations with improved biopharmaceutical properties.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za prehranu i dijetoterapiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ PROBAVE NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA NANOČESTICA SELENA

Lana Mravičić

#### SAŽETAK

Razvoj novih oblika nutraceutika za per os primjenu korištenjem zelenih i održivih formulacijskih pristupa koji se uklapaju u načela kružne ekonomije vrlo je dinamično i aktualno područje istraživanja. U ovom radu istražene su mogućnosti zelene sinteze nanočestica Se korištenjem pomoćnih tvari koje je moguće jednostavnim i zelenim postupcima izolirati iz prehrambenog otpada te je provedena funkcionalna karakterizacija dobivenih nanosustava s posebnim naglaskom na gastrointestinalnu stabilnost. U postupku sinteze kao stabilizacijska sredstva korišteni su pektini različitog stupnja čistoće (sirovi i pročišćeni) te iz različitih izvora (kora mandarine i komina rajčice), a u svrhu dodatne funkcionalizacije površine nastalih nanosustava korišten je ekstrakt komine masline bogat polifenolima. Svojstva nanočestica prije i nakon in vitro simulacije probave karakterizirana su određivanjem raspodjele veličine čestica, zeta potencijala, indeksa polidisperznosti te ukupnog redukcijskog potencijala. Predloženi zeleni postupci sinteze nanočestica rezultirali su nastankom stabilnih nanosustava odgovarajućih fizikalno-kemijskih svojstava. Polifenoli masline uspješno su primijenjeni za funkcionalizaciju površine nanočestica selen te su značajno povećali redukcijski potencijal sustava. Tijekom probave dolazi do promjena fizikalno-kemijskih karakteristika nanosustava, međutim sve istražene nanočestice ostaju stabilne i primjenjive za per os primjenu. Dobiveni rezultati pridonijet će trenutnim saznanjima o mogućnostima održivih postupaka formulacije visokovrijednih oblika selen za peroralnu primjenu poboljšanih biofarmaceutskih svojstava.

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

Rad sadrži: 60 stranica, 30 grafičkih prikaza, 2 tablice i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Selen, nanočestice, pektini, kora mandarine, komina rajčice, zeta potencijal, stabilnost, antioksidacijski potencijal

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. Jasna Jablan**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Emerik Galić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Kolovoz. 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of diet and dietotherapy  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### THE EFFECT OF DIGESTION ON PROPERTIES OF SELENIUM NANOPARTICLES

Lana Mravičić

#### SUMMARY

Development of innovative nutraceuticals for oral administration by using green and sustainable formulation approaches that fit into the principles of the circular economy is particularly dynamic and contemporary area of research. This research investigated the possibilities of green synthesis of Se nanoparticles using excipients that can be isolated from food waste by applying simple and green procedures. Functional characterization of the obtained nanosystems was carried out with special emphasis put on the investigation of on gastrointestinal stability. In the synthesis process pectins of different degrees of purity (raw and purified) and from different sources (tangerine peel and tomato pomace) were used as stabilizing agents, and for the purpose of additional functionalization of the surface of the resulting nanosystems, olive pomace extract rich in polyphenols was used. The properties of nanoparticles before and after in vitro digestion simulation were characterized by determining the particle size distribution, zeta potential, polydispersity index and total reduction potential. The proposed green synthesis procedure resulted in the creation of stable selenium nanosystems with appropriate physicochemical properties. Olive waste derived polyphenols were successfully applied to functionalize the surface of selenium nanoparticles and significantly increase the reduction potential of obtained nanoparticles. Even though digestion process altered particular physicochemical characteristics of the investigated nanosystems, all investigated nanoparticles remained stable and applicable for per os application. Obtained results will contribute to current knowledge about the possibilities of sustainable formulations of innovative per os selenium formulations with improved biopharmaceutical properties.

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

Thesis includes: 60 pages, 30 figures, 2 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Selenium, nanoparticles, pectins, mandarin peel, tomato pomace, zeta potential, stability, antioxidant potential

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  
**Jasna Jablan, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Emerik Galić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August. 2024.

