

# Gastrointestinalna stabilnost nanočestica selena

---

Štimac, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:770059>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Repository / Repozitorij:

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



Jelena Štimac

# **Gastrointestinalna stabilnost nanočestica selena**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na strpljenju i pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Također, zahvaljujem se asistenticama Kristini Radić i Nikolini Golub na velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Najviše hvala mojim roditeljima i sestri koji su mi svo ovo vrijeme bili potpora i trpili moj svakodnevni vrtlog emocija. Posebno hvala na svim čokoladama koje sam dobila, učinile su svaku moju bitku barem malo slađom.*

*Hvala prijateljicama koje su mi obogatile ove trenutke studiranja i borile se zajedno samnom.*

*Hvala i tebi Ivane što si vjerovao u mene i imao strpljenja za sve moje mušice. Uvijek si mi uspio izmamiti osmijeh na lice i učiniti svaki trenutak ljepšim.*

## SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Nanočestice.....	1
1.2	Selen .....	2
1.3	Nanoselen .....	5
1.4	Gastrointestinalna stabilnost i biodostupnost nanočestica selena.....	8
1.5	Pektini.....	11
1.6	Komina masline.....	14
1.7	Komina rajčice.....	14
1.8	Komina citrusa.....	14
2	OBRAZLOŽENJE TEME .....	15
3	MATERIJALI I METODE .....	16
3.1	Materijali .....	16
3.2	METODE.....	18
3.2.1	Ekstrakcija pektina iz komine mandarine i rajčice.....	18
3.2.2	Izrada ekstrakta komine masline .....	21
3.2.3	Zelena sinteza nanoselena .....	22
3.2.4	Ispitivanje gastrointestinalne stabilnosti nanoselena.....	25
3.2.5	Spektrofotometrijsko određivanje nanoselena .....	29
3.2.6	Određivanje raspodjele veličine čestica nanoselena .....	30
3.2.7	Određivanje zeta-potencijala nanoselena .....	31
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	32
4.1	REZULTATI .....	32
4.1.1	Karakterizacija nanočestica selena prije <i>in vitro</i> gastrointestinalne digestije ....	32
4.1.2	Nanočestice nakon gastrointestinalne digestije.....	34
4.2	RASPRAVA.....	40
5	ZAKLJUČCI.....	44
6	LITERATURA .....	46
7	SAŽETAK .....	50
8	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1 UVOD

## 1.1 Nanočestice

Prefiks nano- dolazi od grč. *nânos*, *nânnos* što znači patuljak ([www.jezikoslovac.com](http://www.jezikoslovac.com)). Nanočestice uključuju čestice veličine 1-100 nm te se proizvode korištenjem nanotehnologije. Biološka, kemijska i fizikalna svojstva takvih čestica ovise o njihovoj veličini, obliku te omjeru površine i volumena (Murugesan i sur., 2019). Ovisno o metodi izrade dijelimo ih na nanosfere i nanokapsule. Čestice kod kojih je lijek uklopljen ili adsorbiran na površinu nazivaju se nanosfere, a one kod kojih je lijek zatvoren u šupljini okružen polimernim matriksom nazivamo nanokapsule (Mohanraj i Chen, 2006).

Nanotehnologija pokazala se izuzetno korisnom u različitim poljima znanosti, a naročito u nanomedicini i isporuci lijekova u organizmu. Nanomedicina predstavlja ogranak medicine koja koristi nanotehnologiju kako bi spriječila i liječila razne bolesti, koristeći pritom nanosustave, kao što su nanočestice, i nanorobote za postavljanje dijagnoze, dostavu lijeka te za senzorne i aktivacijske svrhe u živim organizmima. Sve se više proučava zbog velikog interesa za to područje, uključujući pritom još i nanobiotehnologiju i tkivno inženjerstvo (Patra i sur., 2018).

Kod isporuke lijekova putem većih čestica često se susreću izazovi kao što su *in vivo* nestabilnost, loša biorasploživost, topljivost i apsorpcija, te neželjene nuspojave lijekova. Smatra se da novi sustavi za isporuku lijekova, kao što su nanosustavi koji mogu ciljano djelovati, mogu riješiti neke od ovih ključnih problema. Takve čestice imaju veću biorasploživost jer se apsorbiraju procesom endocitoze. Isto tako pokazuju manje fluktuacije koncentracija u plazmi, a zbog svoje veličine lakše prodiru u tkiva što ih čini izrazito pogodnim za ciljanu dostavu. Pritom im pomaže i mogućnost vezanja različitih liganda na površini, čime se olakšava njihovo usmjeravanje u organizmu (Patra i sur., 2018).

Iako veličina čestica i njihova površinska svojstva uvelike potpomažu nanosustavima u njihovoj primjeni, ponekad se pokazuju kao i njihovi nedostaci. Zbog male veličine, ali velike dodirne površine, može doći do agregacije čestica. Zato je bitno svojstvo čestica zeta potencijal koji predstavlja površinski naboj čestica, a na koji utječu sastav čestica i medij u kojem su dispergirane. Čestice sa zeta potencijalom većim od  $\pm 30$  mV pokazuju stabilnost u suspenziji jer površinski naboj onemogućava njihovu agregaciju.

Uz agregaciju, isti čimbenici dovode do limitiranog uklapanja lijeka u česticu te mogu izazvati tzv. "burst effect" odnosno nekontrolirano i naglo otpuštanje lijeka. Također, potrebno je reducirati opsonizaciju. Ona predstavlja proces vezanja proteina opsonina na čestice pri čemu one postaju mete fagocita. To je moguće riješiti djelovanjem na površinu čestica, kako bi se produljila cirkulacija čestica *in vivo*. Svi ovi izazovi trebaju biti savladani prije uporabe nanočestica u kliničke ili komercijalne svrhe (Mohanraj i Chen, 2006).

Nanočestice uvelike pronalaze svoju primjenu u liječenju tumora. Zbog povećane permeabilnosti i retencije te aktivnim usmjeravanjem na mjesto djelovanja putem specifičnih liganda na površini nanočestica, moguće je dostaviti velike količine lijeka u tumor. Velika prednost ovakvog načina liječenja je to što se zbog ciljanog mjesta djelovanja, okolno, zdravo tkivo ne izlaže djelovanju lijeka te se iz tog razloga smanjuju količina i intenzitet nuspojava (Mohanraj i Chen, 2006). Moguća je primjena nanočestica u različitim dodacima prehrani, pri čemu se inkapsulacijom u nanočesticu može poboljšati bioraspoloživost aktivnih tvari tako što se modificiraju neka njihova svojstva, primarno osjetljivost na pH, žuč i utjecaj probavnih enzima (Hosnedlova i sur., 2018).

## 1.2 Selen

Selen je nemetal, u prirodi pronađen u tragovima u svom elementarnom obliku ( $\text{Se}^0$ ) te u obliku selenida ( $\text{Se}^{2-}$ ), selenata ( $\text{Se}^{6+}$ ;  $\text{SeO}_4^{2-}$ ) i selenita ( $\text{Se}^{4+}$ ;  $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Karakterizira ga lakoća prijelaza u susjedna oksidacijska stanja, na što utječu pH, koncentracija slobodnog kisika, redoks potencijal i vlažnost. Moguće ga je pronaći u 5 alotropskih modifikacija, od čega su 2 u amorfnom stanju, a 3 u kristalnom. Selen pokazuje i sposobnost formiranja prstenastih i lančastih struktura. Većina njegovih izotopa je stabilna, osim radioaktivnog izotopa  $^{75}\text{Se}$  koji emitira  $\beta$  i  $\gamma$  zračenje. Najrasprostranjeniji izotop u prirodi je  $^{80}\text{Se}$  (Kieliszek, 2019).

Selen je poprilično rasprostranjen element u okolišu. Moguće ga je pronaći u hidrosferi, litosferi, biosferi i atmosferi Zemlje. Djelovanjem vulkana, razgradnjom organske tvari bogate selenom i biometilacijom od strane mikroorganizama, njime se obogaćuje atmosfera. Gledajući globalne razmjene, razina selena u tlu iznosi 0,33-2 mg/kg. U vodi ga pronalazimo u tragovima, s time da ga ima više u podzemnim vodama nego morskoj vodi uslijed eluiranja selena sa stijena ili pretjerane gnojidbe tla proizvodima bogatim selenom (Kieliszek, 2019).

Selen je jedan od esencijalnih elemenata našeg organizma. Njegova količina u tijelu varira ovisno o prehrani, dobi i geografskom smještaju. Optimalna dnevna doza selena iznosi 55 µg dok je njegova ukupna količina u organizmu 3-20 mg. Kao indikator statusa selena koristi se serum u kojem je koncentracija 60-120 ng/ml. Koncentracija selena naglo pada nakon navršenih 60 godina života (Kieliszek, 2019). Nedostatak selena kod ljudi je rijedak, a očituje se kao Keshan bolest, endemska kardiomiopatija, ili Keshan-Beck bolest, endemski osteoartritis. Obje bolesti pojavljuju se u Kini u područjima s niskom razinom selena u tlu. Nedostatak selena povezuje se s povećanom incidencijom različitih kroničnih bolesti kao što su bolesti dišnog sustava (astma), kardiovaskularne bolesti, rak te mnoge druge (Thomson, 2004). Nedostatak selena utječe i na živčani sustav. Kod pojedinaca je uočena pojava depresije ili pojačavanje anksioznosti, a također djeluje i na pojavu Alzheimerove bolesti. U trudnica nedostatak selena negativno utječe na razvoj embrija (Kieliszek, 2019).

Selen se u najvećoj mjeri u organizam unosi ingestijom. Hrana bogata proteinima sadrži više razine selena, dok voće i povrće, te namirnice s niskom razinom proteina, imaju i nižu razinu istog. Tako se u hranu bogatu selenom ubrajaju meso, riba i morski plodovi, mliječni proizvodi i orašasti plodovi (*Tablica 1.*). Koncentracija selena u hrani životinjskog porijekla ovisi o geografskom položaju i opskrbi selena u prehrani (Kieliszek, 2019).

*Tablica 1.* Sadržaj selena u odabranim prehrambenim proizvodima

Hrana	Sadržaj selena (µg/g)
Brazilski orasi	0,2-512
Kvasac	500-4000
Kruh	0,09-0,20
Riba	0,06-0,63
Jaja	0,15
Govedina	0,01-0,73
Svinjetina	0,27-0,35
Brokula	0,012
Mlijeko	0,01-0,06
Čokolada	0,04
Jetra	0,3-0,4
Goveđi bubreg	1,45

Biodostupnost i biološka aktivnost unesenog selena ovise o količini unesenog selena, njegovom obliku, topljivosti, dostupnosti i probavljivosti, prisutnosti drugih dijetalnih komponenti i fiziološkog statusa organizma. Kada je riječ o prehrani, organske forme selena imaju veću bioraspoloživost iz hrane i to 85-95%, dok je anorganske forme imaju tek 40-50% (Constantinescu-Aruxandei i sur., 2018). U obliku selenometionina selen se pojavljuje u namirnicama biljnog i životinjskog porijekla te u dodacima prehrani; u obliku selenocisteina uglavnom u namirnicama životinjskog porijekla te kao selenat i selenit uglavnom u dodacima prehrani. Bioraspoloživost i tkivna distribucija selena ovise o obliku selena kojeg unosimo u organizam. Selenocistin predstavlja metabolički aktivnu formu selena te se u toj formi nalazi u selenoproteinima. Redukcijom selenita i selenata nastaje selenid, a zatim daljnjom redukcijom selenofosfat. On predstavlja prekursor selenocisteina. Iz tog su razloga selenit i selenat metabolički dostupnije forme od selenometionina koji nije metabolički aktivan te je potrebno više koraka u njegovom katabolizmu kako bi nastao anorganski prekursor selenofosfat. (Rayman, 2000).

Pri visokim koncentracijama selen može pokazati i toksična svojstva. Ona mogu nastupiti kod unosa selena 1540-1600  $\mu\text{g}/\text{dan}$  (Kieliszek, 2019). Znakovi trovanja selenom uključuju gubitak kose, tešku anemiju, ukočenost i sljepoću. Simptomi toksičnosti ovise o dozi, a nastaju zbog krivo složenih, disfunkcionalnih selenoproteina i enzima ovisnih o selenu koji mogu dovesti do disbalansa u funkcioniranju stanice (Kieliszek, 2019). Organski oblici selena su manje toksični od anorganskih, a pritom se i učinkovitije apsorbiraju. Anorganski oblici selena,  $\text{Se}^{+4}$  i  $\text{Se}^{+6}$ , su 40 puta toksičniji od organskog selena, a pritom je  $\text{Se}^{+4}$  10 puta toksičniji od  $\text{Se}^{+6}$  (Constantinescu-Aruxandei i sur., 2018).

Selen je element jake antioksidativne učinkovitosti. Djeluje sinergijski s vitaminom E. Njihova interakcija dovodi do najbolje zaštite organa od destruktivnog djelovanja slobodnih radikala. Zbog svojih antioksidativnih svojstava izrazito je bitan u ljudskom organizmu pa je tako otkriveno nekoliko o selenu ovisnih proteina koji sadrže selen, u formi selenocisteina, u aktivnom centru. Najbolje karakteriziran selenoprotein u sisavaca je glutation peroksidaza, ali i selenoprotein P i tiroksin 5-dejodinaza (Kieliszek, 2019). Glutation peroksidaza sadrži 4 identične podjedinice. Svaka od njih sadrži selenocisteinski ostatak (Stadtman, 1990). Peroksidaza reducira vodikov peroksid pri čemu nastaje oksidirani oblik glutaciona koji se potom opet reducira uz glutation reduktazu i NADPH (Lockitch, 1989). Kao produkti redukcije peroksida nastaju hidroksilne specije i voda (Kieliszek, 2019). Zajedno s superoksid dizmutazom i katalazom dio je antioksidativnog obrambenog sustava organizma koji ga brani



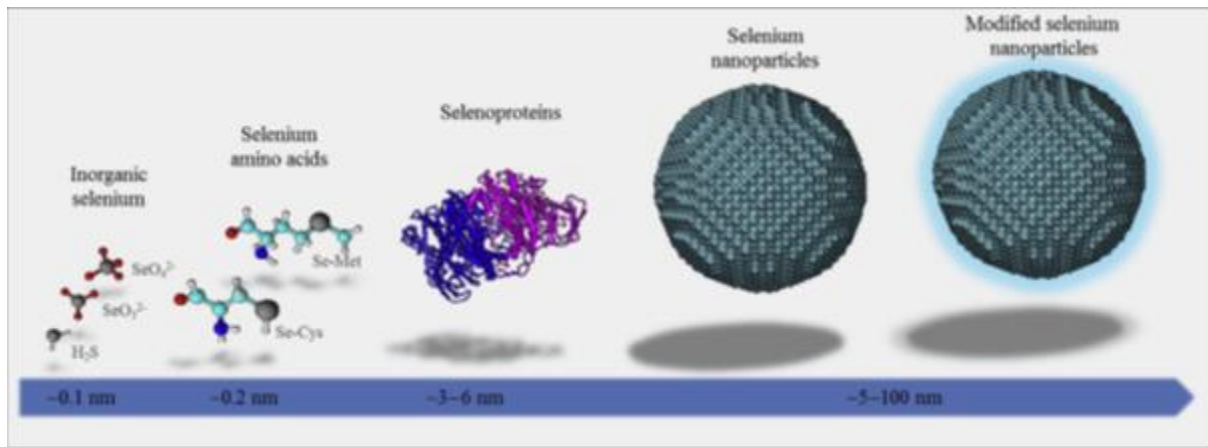
od slobodnih radikala (Lockitch, 1989). Tim mehanizmom, eliminacijom vodikovog peroksida, glutation peroksidaza štiti eritrocite, masne kiseline i hemoglobin od oksidacije te štiti stanične membrane i DNA od štetnih učinaka slobodnih radikala i rekativnih kisikovih spojeva. Antioksidativna i protektivna svojstva selenoproteina prema DNA temelj su antikancerogenih svojstava selena. Glutation reduktaza također sadrži selen. Njezina je glavna uloga održavanje prikladne koncentracije reducirane glutation peroksidaze pri čemu štiti stanicu od nakupljanja peroksida i njihovih štetnih učinaka. Štitnjača je organ koji sadrži najveću količinu selena po jedinici mase. U štitnjači je selen nužan za pravilnu sintezu, aktivaciju i metabolizam tireoidnih hormona te se u štitnjači nalazi kao dio selenoproteina tiroksin 5-dejodinaze. Taj enzim je odgovoran za dejodinaciju tiroksina do 3,3,5-trijodtiroksina (T3) ili do neaktivnog oblika rT3. Na ove procese u metabolizmu hormona bitno utječe status selena, stoga ga je nužno uzeti u obzir pri pregledu funkcije štitnjače (Kieliszek, 2019).

### 1.3 Nanoselen

Sve se više istražuje primjena nanočestica selena zbog njegovih zanimljivih svojstava i velikog potencijala primjene u medicini kozmetici i elektronici (Murugesan i sur., 2019). Zbog važnih bioloških uloga selena u organizmu, i sve većeg broja indikacija za suplementaciju selenom, sve više se razmatra i primjena nanoselena kao dodatka prehrani (Skalickova i sur., 2017).

Za razliku od njegovih organskih i anorganskih formi, nanoselen pokazuje visok stupanj apsorpcije i nisku toksičnost (Hosnedlova i sur., 2018). Slično kao i druge nanočestice, posjeduje zanimljiva kemijska, fizikalna i biološka svojstva kao što je npr. mala površinu po jedinici volumena. Zbog tog razloga nanočestice su manje interaktivne i sporije otpuštaju selen. Također, moguće je postići njihovu ciljanu dostavu funkcionaliziranjem čestica određenim liganadima. Osobito je važno spomenuti nižu toksičnost nanoselena (selena u njegovom elementarnom obliku) u odnosu na toksičnost iona selena – selenita, selenata i selenida. Nanoselen ima veću bioraspoloživost od anorganskog selena ili aminokiselina koje sadrže selen te može povećati aktivnost selenoenzima peroksidaze i tioredoksin reduktaze (Skalickova i sur., 2017). Provedeno je mnogo istraživanja na temu suplementacije nanoselena u životinjama i rezultati su obećavajući. Istraživanja pokazuju da je veličina glavni čimbenik aktivnosti nanoselena te da su generalno manje nanočestice aktivnije od onih većih (Slika 1.) (Skalickova i sur., 2017). Nedostatak nanoselena je u njegovoj nestabilnosti i laganoj transformaciji u

inaktivni oblik. Njih je moguće promijeniti stabilizacijom čestica inkapsulacijom u pogodni nosač (Hosnedlova i sur., 2018).



*Slika 1.* Usporedba veličina različitih oblika selena i nanočestica selena koje mogu biti modificirane različitim polimerima, kao što je kitozan (Skalickova i sur., 2017)

Nanoselen je moguće sintetizirati kemijskim, fizikalnim i biološkim putem. Morfologija, sastav, veličina i svojstva nanoselena mogu biti drugačiji ovisno o izabranoj metodi sinteze. Pritom je izrazito bitno za čestice prisustvo/odsustvo te priroda oblagajućih sredstava kao što su polisaharidi, proteini pa čak i polifenoli jer oni utječu na njihovu biodostupnost, toksičnost i učinke nanomolekula tako što djeluju na njihovu veličinu, hidrofobnost i površinski naboj (Constantinescu-Aruxandei i sur., 2018). Kontrola najvažnijih parametara tijekom sinteze (kao što su koncentracija prekursora, pH, temperatura reakcijske smjese i vrijeme pripreme) važna je za postizanje željenih svojstava novosintetiziranih nanočestica - veličine, oblika i površinske funkcionalnosti čestice (Skalickova i sur., 2017).

Biološka sinteza nanočestica sve je popularnija jer se njome nastoje nadomjestiti nedostaci klasičnih koraka sinteze. Ona uključuje prirodne izvore kao što su enzimi, bakterije i biljke. Sintezom nanoselena korištenjem biljnih ekstrakata postižu se bolja svojstva jer je za vrijeme sinteze moguće u nanočestice uklopiti i različite bioaktivne sastojke, kao što su fenoli, flavonoidi, saponini, tanini, glikozidi u jednom koraku tijekom sinteze, a koji pritom djeluju kao reducens i stabilizatori. Njezine prednosti nad klasičnim metodama su održivost, niska cijena, jednostavnost i sigurnost za okoliš (Korde i sur., 2020). Biološki sintetizirane nanočestice su stabilne, tj. ne stvaraju agregate zbog inkapsulacije i stabilizacije biomolekulama na njihovoj površini (Kumar i Prasad, 2020).

Biološka svojstva nanočestica selena ovise o njihovoj veličini pri čemu manje čestice imaju veću aktivnost jer veličina čestica utječe na njihovu apsorpciju. Oralna primjena nanoselena

smatra se najprimjerenijom i isplativom metodom suplementacije (Hosnedlova i sur., 2018). Danas se najčešće primjenjuje u antitumorskoj terapiji, a posjeduju i antioksidativna i antimikrobna svojstva koja su izrazito zanimljiva kada je riječ o antibiotskoj rezistenciji (Korde i sur., 2020). Prednost nanoselena u odnosu na elementarni selen su visoka gustoća selena u formulaciji te potencijal dostave velikih količina selena lokalno, tj. u stanice raka (Skalickova i sur., 2017). Nanoselen pokazuje važnu ulogu u terapiji karcinoma. U studijama koje se provode najčešće se koristi biološki sintetiziran nanoselen. Njegovo djelovanje temelji se na mogućnosti da ubija stanice raka apoptozom. Kod staničnih linija raka dojke MCF-7 nanoselen funkcionaliziran folnom kiselinom izaziva apoptozu stanica, što je uzrokovano produkcijom reaktivnih kisikovih specija (ROS) koje dovode do oštećenja mitohondrija te posljedično i stanične smrti (Murugesan i sur., 2019). Nanoselen konjugiran s folatom pokazao je antagonistički efekt na multirezistentne jetrene stanice raka. Nanočestice selena štite organizam od toksičnih učinaka teških metala i kemikalija tako što smanjuju produkciju reaktivnih kisikovih specija. Djeluje kao antioksidans tako što reducira slobodne radikale regulirajući pritom ROS i glutation peroksidazu kako bi zaštitili stanicu od oštećenja (Kumar i Prasad, 2020). Zbog sve veće rezistencije bakterija na antibiotike, istražuje se potencijal nanoselena i u tom području. Njegov mehanizam djelovanja uključuje vezanje nanočestica na površinu bakterije te otpuštanje iona selena u staničnu stijenku pri čemu uzrokuje oksidacijski stres, inhibiciju sinteze proteina ili mutaciju DNA i na taj način uništava bakteriju (Skalickova i sur., 2017). Sve je veća uloga nanoselena i u liječenju bolničkih infekcija - studije su se pokazale djelotvorne u ubijanju tih mikroba (Murugesan i sur., 2019).

Za morfološku i strukturalnu karakterizaciju nanoselena najčešće se koriste mikroskop atomskih sila (AFM), skenirajući elektronski mikroskop (SEM), prijenosni elektronski mikroskop (TEM) i difrakcija X-zraka (XRD). Za karakterizaciju koriste se još i UV/Vis spektroskopija i vibracijska spektroskopija koja uključuje FTIR i Raman spektroskopiju. Energetski disperzivna rentgenska spektroskopija koristi se sama ili zajedno s TEM i SEM pri identifikaciji selena. Veličinu čestica moguće je odrediti korištenjem metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS), kromtografijom isključivanja veličina (SEC) i TEM metodom. Problem ovih metoda su visoka cijena i nemogućnost da ih se uvrsti u rutinsku analizu nanoselena u suplementima. Informacije koje se njima dobivaju su uglavnom kvalitativne, a pritom je niske koncentracije od  $\mu\text{g}/\text{kg}$  teško detektirati, karakterizirati i kvantificirati. Metoda induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS) zasad izgleda obećavajuće zbog ne-destruktivne, kontinuirane separacije čestica s visokom rezolucijom od 1-100 nm

kojom se omogućava separacija izrazito malih čestica. Pritom može biti spregnuta s različitim metodama pomoću kojih omogućava bolju i precizniju karakterizaciju (Constantinescu-Aruxandei i sur., 2018).

#### **1.4 Gastrointestinalna stabilnost i biodostupnost nanočestica selena**

Brojne studije govore kako je veličina čestica ključan parametar za biološku aktivnost nanoselena. Manje čestice su aktivnije i pokazuju jači citotoksičan učinak od većih nanočestica. Neka istraživanja pokazuju da nanoselen ima veću biodostupnost i učinkovitost od anorganskih oblika i aminokiselina koje sadrže selen (Skalickova i sur., 2017). U radu Cavala i sur. (2017) prikazano je da nanoselen ima sličnu bioraspoloživost kao i drugi oblici selena, a ako se uspoređuje s selenometioninom, nanoselen pokazuje manju toksičnost i jednaku učinkovitost u povećanju aktivnosti selenoenzima. U radu Hosnedlove i sur. (2018) zaključuju da biološka svojstva nanoselena ovise o njegovoj veličini jer o veličini čestica ovisi njihov transport u stanice. Tako je npr., *in vitro* apsorpcija čestica veličine 0,1  $\mu\text{m}$  za 2,5-6 puta veća nego onih veličine 1-10  $\mu\text{m}$ . Stoga je tijekom formulacije potrebno uzeti u obzir veličinu nastalih čestica i njihovu morfologiju. Važan korak u tom procesu je odabir vrste i koncentracije inkapsulacijskih sredstava koji zbog različite konformacije i strukture mijenjaju sterička svojstva i elektrostatske interakcije te posljedično veličinu i stabilnost nastalih nanočestica. Utjecaj pH na čestice također ovisi o navedenim parametrima (Constantinescu-Aruxandei i sur., 2018).

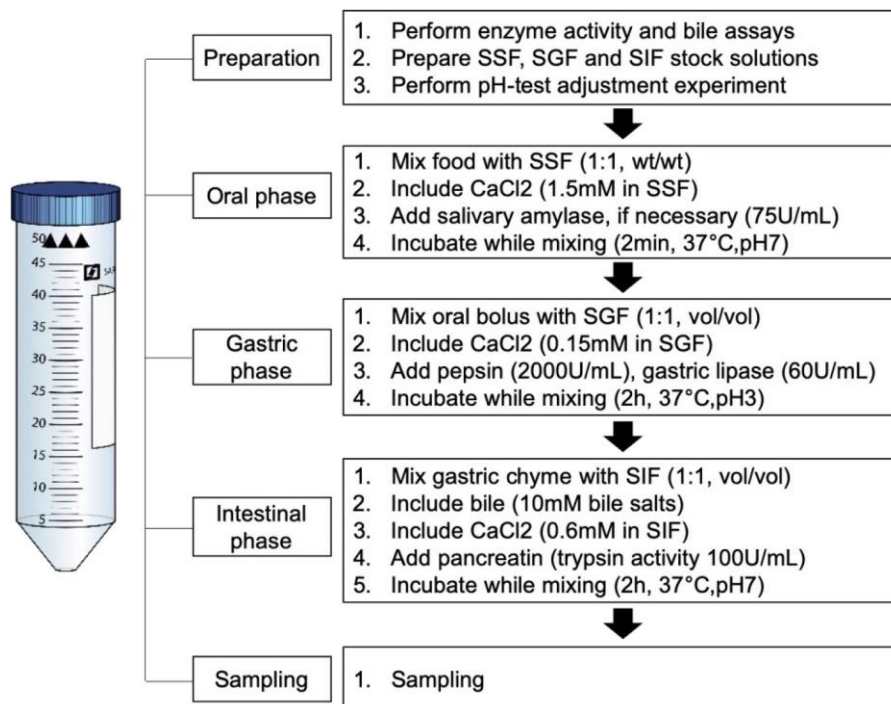
Unos, apsorpcija, translokacija i ekskrecija nanoselena određena je različitim parametrima koji uključuju i veličinu i površinska svojstva nanočestica. (Hosnedlova i sur., 2018). Topljivi oblici selena većim se dijelom apsorbiraju u nižim dijelovima tankog crijeva različitim mehanizmima koji ovise o obliku selena. Prvi korak uključuje prolazak kroz sloj mukusa kojim je prekrivena površina GIT-a, a za taj proces su bitni njihov naboj i veličina. Sljedeći korak uključuje prolazak kroz polarizirane epitelne stanice koje izlučuju mukus, a poredane su u nekoliko slojeva. Interakcija s proteinima djeluje na svojstva površine nanočestica što dovodi do promjene površinskog naboja i sklonosti aglomeraciji. Aglomeraciju može potaknuti promjena pH u GIT-u. Karakterizacija veličina nanočestica selena stabiliziranoj pektinima, smjesom pektini/alginati te ovalbuminom, pokazala je da se tijekom inkubacije nanoselena u gastrointestinalnim uvjetima (pH 2,0-7,0), uključujući i enzimatski i neenzimatski medij,

mijenjaju površina i raspodjela veličine čestica. Primijećeno je da su pri uvjetima probave uz enzime (uz dodatak pepsina) i pH 2,0 čestice manje (~2-11 nm), dok je pri pH 7,0 primijećen obrnut efekt, tj. čestice su uglavnom veće (~50 nm). Iz ovoga možemo zaključiti kako gastrični enzimi i pH koji varira u GIT-u mogu uzrokovati značajne promjene u veličini (Skalickova i sur., 2017).

Bioraspoloživost i gastrointestinalnu stabilnost moguće je proučavati *in vivo* na ljudima, ali takve su studije problematične jer nisu uvijek tehnički, financijski i etički pouzdane te ih je teško reproducirati zbog individualnih razlika (Li i sur., 2020). Istraživanja se provode i na životinjama, ali ona uključuju operacije i usmrćivanje životinja, a pritom je i upitna učinkovitost takvih modela u razumijevanju ljudskih probavnih procesa (Brodkorb i sur., 2019). Iz navedenih razloga sve se više poseže prema razvoju *in vitro* modela, koji su jeftiniji, učinkovitiji i bez etičkih restrikcija. Razvoj takvih modela je kompliciran zbog kompleksnosti ljudskog gastrointestinalnog sustava, njegovog motiliteta, anatomske strukture, brojnih enzima i hormona koji su ključni u normalnom radu GIT sustava, a koje je teško simulirati *in vitro*. Stoga su potrebna daljnja istraživanja i naponi kako bi se razvili poboljšani i biološki relevantni *in vitro* GIT modeli (Li i sur., 2020).

*In vitro* metode simulacije probave uključuju statičke i dinamičke modele kojima se nastoji simulirati probava hrane i farmaceutika u gornjem dijelu GIT-a (usta, želudac, tanko crijevo). Dinamički *in vitro* modeli simuliraju dinamičke procese probave, mehaničke sile te dinamiku fluida tijekom procesa (Li i sur., 2020). Ovakvi modeli su kompleksni, visoke cijene postavljanja i održavanja pa nisu dostupni većini istraživača. Statički modeli su jednostavniji i rašireniji i koriste konstantan omjer hrane, enzima i elektrolita te konstantan pH za svaku fazu digestije (Brodkorb i sur., 2019). Njihova prednost su jednostavnost i niska cijena (Bohn i sur., 2018). Problemi ovakvih metoda su preveliko pojednostavljivanje procesa probave i značajne varijacije parametara digestije u različitim modelima. Varijabilnost parametara koji uključuju pH, trajanje svakog koraka digestije, količinu i tip korištenih probavnih enzima, brzinu miješanja/mučkanja, količinu uzorka hrane itd. mogu dovesti do velikih razlika u istraživanjima i tako omesti usporedbu rezultata i zaključke istraživanja (Li i sur., 2020). Zbog velikog broja protokola koji se razlikuju u eksperimentalnim uvjetima postignut je internacionalni konsenzus u okviru COST Action Infogest-a te je objavljen protokol koji se od tada koristi u međunarodnim okvirima (Bohn i sur., 2018). Uslijed razlika u parametrima postignut je konsenzus na temelju kojega su određeni parametri za statičku *in vitro* digestiju hrane u odraslih osoba, a metoda je generalno prozvana INFOGEST (Brodkorb i sur., 2019).

INFOGEST metoda (Slika 2.) uključuje 3 faze: priprema, digestija i obradu uzorka s naknadnom analizom. Za pripremu je bitno eksperimentalno ispitati aktivnost svih probavnih enzima i koncentraciju žučnih soli korištenjem preporučenih standardiziranih testova. Hrana se potom izlaže trima uzastopnim fazama probave, a to su oralna, gastrična i intestinalna. U statičkoj *in vitro* digestiji eksperimentalni uvjeti su konstantni za svaku fazu. Oralna faza uključuje razrjeđenje uzorka 1:1 sa simuliranom salivarnom tekućinom (SSF), sa ili bez salivarnih amilaza i simuliranje mastifikacije za krutu i polukrutu hranu. Ako se primjenjuje salivarna amilaza, hrana joj treba biti izložena 2 minute na pH 7. Oralna faza mora biti uključena u svim simuliranim procesima digestije, bez obzira na stanje hrane (kruto/tekuće), kako bi se postiglo konstantno razrjeđenje. Oralni bolus se tada razrjeđuje 1:1 sa simuliranom gastričnom tekućinom (SGF) i gastričnim enzimima, pepsinom i gastričnom lipazom, nakon čega slijedi inkubacija na 2 sata pri pH 3,0. Gastrični himus se potom razrjeđuje 1:1 sa simuliranom intestinalnom tekućinom (SIF), žučnim solima i enzimima pankreasa na 2 sata pri pH 7,0. Zadnji korak digestije uključuje uzorkovanje, obradu uzorka, skladištenje i naknadnu analizu uzorka (Brodkorb i sur., 2019).

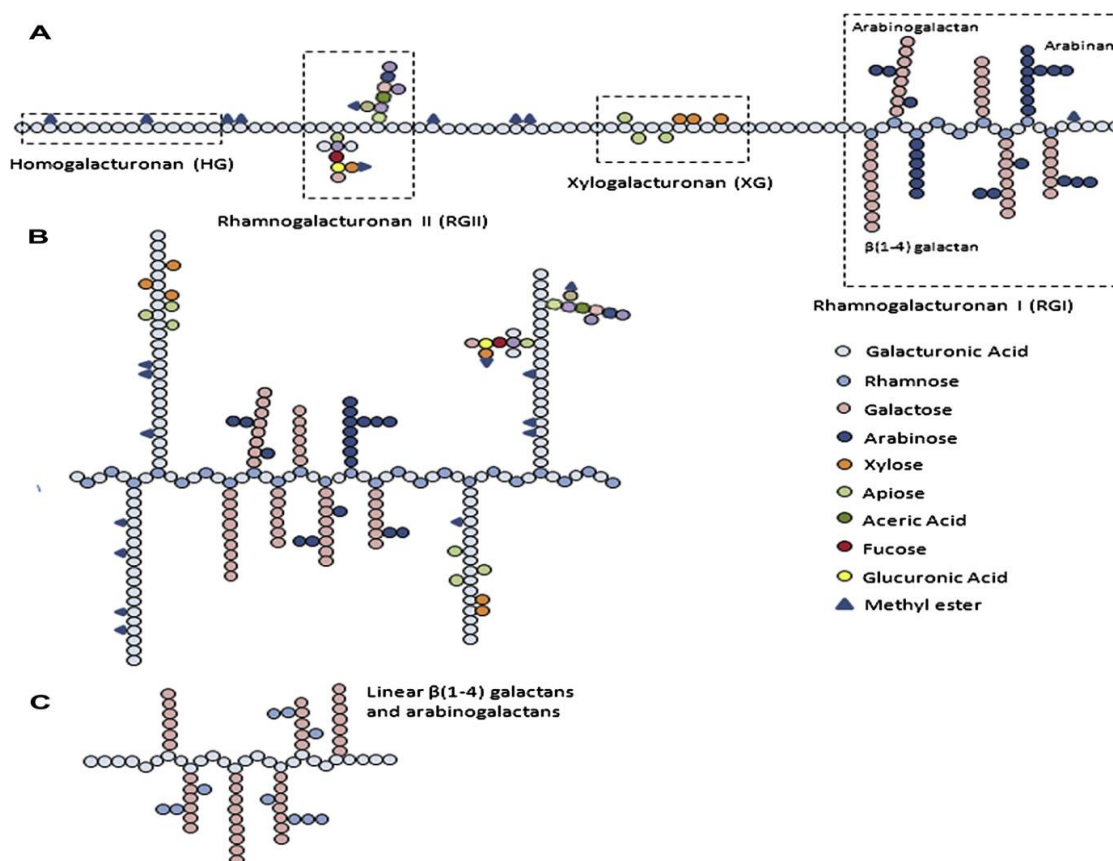


Slika 2. Statička *in vitro* digestija predložena od strane COST INFOGEST-a (Li i sur., 2020)

## 1.5 Pektini

Pektini su prirodni polisaharidi, dobiveni iz voća (najčešće iz komine jabuke i kore citrusa) i povrća, koji se već godinama koriste u prehrambenog industriji i industriji pića kao ugušćivači, gelirajući agensi i stabilizatori. Zbog njihovih svojstava postaju sve zanimljiviji i u farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji (Sriamornsak, 2003). S obzirom da se porastom populacije povećala i količina otpada, a pritom i briga za okoliš, stručnjaci pokušavaju pronaći načine kako što bolje gospodariti otpadom. Iz tog se razloga otpad od hrane (prvenstveno voća) pokušava iskoristiti kao izvor pektina. Ekstrakcija, kao jeftin i jednostavan postupak, omogućava izolaciju molekula, u ovom slučaju pektina, koje je pritom moguće koristiti kao dodatke prehrani i nutriceutike (Gama i sur., 2015).

Pektini pripadaju obitelji polisaharida bogatih galakturonskom kiselinom. Ona čini 70% ukupne strukture pektina (Mohnen, 2008). Samu strukturu možemo podijeliti na glatku regiju (*smooth region*) i razgranatu regiju (*hairy region*). *Smooth region* većim dijelom čini hemogalakturonan koji je većim dijelom građen od homopolimera parcijalno metil esterificirane (1-4) vezane  $\alpha$ -D-galakturonske kiseline. *Hairy region* čini ramnogalakturonan I (RGI) čiju okosnicu čini ponavljajući niz disaharida  $\alpha$ -D-galakturonske kiseline i ramnoze [-4)- $\alpha$ -D-GalA-(1,2)- $\alpha$ -L-Rha-(1)]<sub>n</sub> te postranični lanci arabinana, galaktana i arabinogalaktana koji su vezani za ostatke ramnoze. Puno manje od RGI pojavljuju se razgranate strukture ksilogalakturonana (XG) i ramnogalakturonana II (RGII) (Slika 3.) (Maxwell i sur., 2012). Lanac poligalakturonske kiseline parcijalno je esterificiran metilnim skupinama dok su slobodne karboksilne skupine neutralizirane ionima kalija, natrija i amonija. S obzirom na stupanj esterifikacije, pektin dijelimo na visoko metoksilirani (HM; 60-75%) i nisko metoksilirani (LM; 20-40%) pektin (Sriamornsak, 2003).



Slika 3. Prikaz strukture pektina: RGI (*hairy*) regija je vezana za HG (*smooth*) regiju (Maxwell i sur., 2012)

Strukturalno se pektini razlikuju jedni od drugih, a uzrok tome su podrijetlo i smještaj u biljci iz koje se ekstrahiraju te metoda ekstrakcije (Müller-Maatsch i sur., 2016). Najveća količina pektina nalazi se u staničnoj stijenci biljaka. S obzirom na različitu molekulsku veličinu i stupanj esterifikacije, različite vrste pektina imaju različitu sposobnost geliranja (Sriamornsak, 2003).

Najdostupniji izvori pektina su ostaci koji nastaju kao nusprodukti tijekom proizvodnje sokova jabuke i citrusa. Pritom je prednost citrusa u odnosu na jabuke ta što sadrže veću količinu pektina (Dranca i Oroian, 2018). Iako su takvi pektini najčešće korišteni, s obzirom na razmjere primjene u prehrambenoj industriji, kao izvori pektina koriste se još i pulpa šećerne repe, glave suncokreta i mango (Sriamornsak, 2003).

Sposobnost pektina da tvore gel je svojstvo koje ih čini posebno zanimljivima. HM pektin tvori gel u prisutnosti šećera i kiselina. Smatra se da su vodikove veze i hidrofobne interakcije glavni uzrok agregacije pektina. U neutralnom i blago kiselom mediju slobodne, neesterificirane



karboksilne skupine pektina djelomično su prisutne u obliku ioniziranih soli. Pritom se javljaju odbojne sile, prisutne zbog negativnog naboja, koje mogu biti dovoljno jake da spriječe stvaranje mreže pektina. Uz dodatak kiseline, većina se soli pretvara u neionizirane karboksilne skupine koje smanjuju odbojne sile među skupinama i smanjuju privlačne sile između molekula vode i pektina. Dodatkom šećera dodatno se smanjuje hidratacija zbog kompeticije vode i šećera. Ovi uvjeti smanjuju mogućnost pektina da bude u disperznom obliku te hlađenjem tvore gel čija stopa formiranja ovisi o stupnju esterifikacije (Sriamornsak, 2003). LM pektinima potrebna je prisutnost kalcijevih iona kako bi formirali gel. Također, geliranje je moguće uz prisutnost drugih multivalentnih iona, osim magnezijevih iona. Amidacija poboljšava geliranje pektina jer je potrebno manje kalcijevih iona za formiranje gela, a pritom postoji manja šansa taloženja pektina uz visoku koncentraciju kalcijevih iona. Kako bi se povećala čvrstoća gela, moguće je dodati malu količinu šećera. Potreban je oprez jer velike količine šećera interferiraju s formacijom gela jer on doprinosi dehidraciji pektina i vezanju vodikovim vezama što smanjuje umrežavanja silama dvovalentnih iona (Sriamornsak, 2011).

Uporaba pektina široko je rasprostranjena jer se zbog njihovih svojstava često koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji primjenjuju se kao ugušćivači, gelirajući agensi i stabilizatori. U farmaceutskoj industriji njihova primjena korisna je na nekoliko razina. U koncentraciji od  $\geq 6$  g/dan pozitivno djeluju na smanjenje kolesterola u krvi. Djeluju kao profilaksa protiv trovanja toksičnim kationima. Pokazali su se korisni u odstranjivanju olova i žive iz gastrointestinalnog trakta i respiratornih organa uslijed trovanja. Kod i.v. primjene skraćuju vrijeme koagulacije pa pokazuju potencijal kod zaustavljanja krvarenja. Zbog visoke sposobnosti vezanja vode stvara osjećaj sitosti te smanjuju potrebu za unosom hrane. Koriste se kao vezujući agensi, u formulaciji matriksnih tableta s kontroliranim oslobađanjem te kao sredstva za oblaganje u formulaciji velikog broja lijekova. Pektini pokazuju veliki potencijal kao nosači za ljekovite oblike za dostavu lijekova u kolon uslijed njihove acidorezistentnosti i otpornosti prema djelovanju probavnih enzima. Zanimljivi su zbog svojih gelirajućih svojstava i sigurnog toksikološkog profila te imaju obećavajuću budućnost u industriji (Sriamornsak, 2003). U kolonu se pektini razgrađuju pod utjecajem pektinolitičkih enzima i dolazi do otpuštanja lijeka. (Chomto i Nunthanid, 2017). Pektini također omogućuju postizanje kontroliranog oslobađanja lijeka, upravo zahvaljujući svojstvu geliranja koje sprečava penetraciju vode do djelatne tvari i tako kontrolira otpuštanje lijeka iz dozirnog oblika.

## 1.6 Komina masline

Komina masline nastaje tijekom procesa proizvodnje maslinovog ulja prilikom mehaničkog tiještenja plodova masline, bez uporabe ikakvih kemijskih agensa. Nusprodukt koji tada nastaje je čvrsta tvar bogata fenolnim frakcijama kao što su oleuropeinom i hidroksitirozolum. Navedene frakcije imaju izražen povoljan antioksidativni učinak (Cardoso i sur., 2005). Komina koja nastaje tijekom procesa proizvodnje maslinovog ulja bogata je nutrijentima te se može koristiti kao bio gnojivo, a tekućinska frakcija koja također nastaje u procesu proizvodnje može poslužiti kako biogorivo (Jeguirim i sur., 2020).

## 1.7 Komina rajčice

Rajčica je jedna od najčešće korištenih vrsta povrća. Koristi se sirova ili procesirana u obliku sosa od rajčice, paste, soka ili kečapa. Tijekom industrijskog procesa prerade nastaje komina rajčica koju čine kora, koštice i dio pulpe. Navedena komina bogata je pektina, ali sadrži i likopene, prehrambena vlakana te proteine i ulja koja se daljnjom preradom (Grassino i sur., 2020). Uslijed velike količine vode u komini potrebno ju je na ispravan način skladištiti jer voda ubrzava proces kvarenja, a na taj način propadaju velike količine nutritivno vrijednih sastavnica i nastaje nepoželjno velika količina otpada (Lu i sur., 2016).

## 1.8 Komina citrusa

Mandarina predstavlja biljku koja pripada rodu Citrus. Biljke iz toga rod obiluju aktivnim fitokomponentama koje djeluju protektivno na ljudsko zdravlje. Najčešće se primjenjuju u industriji sokova prilikom čega nastaju velike količine kore koja zatim završi kao otpad. Navedena kora predstavlja glavni dio komine citrusa te je bogata ponajviše pektinima, a zatim i prehrambenim vlaknima, polifenolima itd (Rafiq i sur., 2018). Iz te komine moguće je ekstrahirati pektine nakon čega se suha tvar bogata proteinima može upotrebljavati kao hrana za stoku. Također, ekstrahirani pektini mogu se iskoristiti i u farmaceutskoj industriji. Komini se pokušavaju naći nove uloge kako bi se smanjila količina otpada koja nastaje tijekom različitih procesa u industrijama u kojima su glavni sastojak citrusi (Twinomuhwezi i sur., 2020).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Selen je jedan od esencijalnih elementa ključnih za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Primijenjen u nano obliku posjeduje bolje farmakokinetičke parametre u odnosu na anorganske oblike te se zbog toga intenziviraju istraživanja o mogućnostima primjene nanoselena kao dodatka prehrani. Kako bi bile primjenjive, nastale formulacije moraju biti odgovarajućih karakteristika koje će osigurati zadovoljavajuću stabilnost i bioraspoloživost. Za postizanje navedenih svojstava izuzetno je važan odabir inkapsulacijskog sredstva. U tu svrhu sve se češće koriste biološki aktivni prirodni spojevi izolirani iz biomase ili prehrambenog otpada te se na taj način poboljšava funkcionalnost nastalih nanočestica i smanjuje ekološki otisak procesa sinteze.

Glavni ciljevi ovog rada bili su istražiti mogućnosti zelene sinteze nanoselena primjenom sirovih i pročišćenih pektina ekstrahiranih iz kore mandarine i komine i ekstrakta komine masline bogatog polifenolima. Istražen je utjecaj različitih uvjeta sinteze na raspodjelu veličine dobivenih nanočestica i zeta potencijal i gastrointestinalnu stabilnost.

Rezultati ovog istraživanja doprinijeti će značajno trenutno vrlo oskudnim saznanjima o mogućnostima primjene prirodnih ekstrakata u sintezi metalnih nanočestica te gastrointestinalnoj stabilnosti nanoselena te mogućnostima i opravdanosti njegove primjene kao nutraceutika.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

- UZORCI: Komina rajčice i mandarine (prosijano na veličinu 0,8mm)
- Petroleter (Carlo erba reagents, Francuska)
- Limunska kiselina 1-hidrat (Gram-mol, Hrvatska)
- Etanol, 96% (Carlo erba reagents, Francuska)
- Polivinilpirolidon (Sigma-Aldrich, SAD)
- Polisorbat/ Tween 20 (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev selenit (Sigma-Aldrich, SAD)
- L(+)-askorbinska kiselina (Gram-mol, Hrvatska)
- Hidrokloridna kiselina 37% (Panreac Quimica, Španjolska)
- Natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev klorid (Kemika, Hrvatska)
- Kalijev klorid (Gram-mol, Hrvatska)
- Dikalijev hidrogenfosfat (Siegfried Handel, Njemačka)
- Kalcij klorid dihidrat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Magnezijev klorid heksahidrat (Alkaloid, Makedonija)
- Amonij hidrogen karbonat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, SAD)
- Pepsin iz svinjske gastične mukoze,  $\geq 500$  U/mg (Sigma-Aldrich, SAD)
- Pankreatin iz svinjskog pankreasa, 8×USP (Sigma-Aldrich, SAD)
- Žučne soli (Sigma-Aldrich, SAD)
- ultračista voda

## INSTRUMENTI:

- Analitička vaga (Mettler Toledo, AB236-S, Indija)
- Vodena kupelj s tresilicom (GFL, 1086, Njemačka)
- Pješčana kupelj (INKO, SK6ESS, Hrvatska)
- pH-metar (Metrohm, 702 SM Titrino, Švicarska)
- Termostat (INKO, Hrvatska)
- Magnetska miješalica (2mag AG, MIX 15 eco, Njemačka)
- Mlinac za kavu Miki (MK84, Končar, Hrvatska)
- Inkubator (BIOSAN, ES-20/60, Latvija)
- Vortex mixer (LMS Mixer uzusio, VTX-3000L, Japan)
- Multi-rotator (BIOSAN, Multi Bio RS-24, Latvija)
- UV/Vis spektrofotometar + čitač mikrotitarskih pločica (PerkinElmer, Victor X3, SAD)
- Rotavapor (Büchi, R-200, Švicarska)
- Zetasizer (Nano ZS, Malvern, UK)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Ekstrakcija pektina iz komine mandarine i rajčice

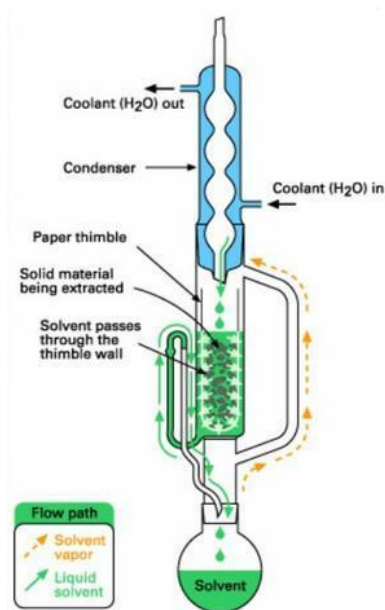
#### 3.2.1.1 Odmašćivanje komine mandarine i rajčice primjenom Soxhlet ekstrakcije

Soxhlet ekstrakcija, poznatija kao ekstrakcija čvrsto-tekuće, uključuje ekstrakciju organskih spojeva otapalom iz krutog uzorka (De Castro i Garcia-Ayuso, 1998). Pritom se čvrsti uzorak, iz kojeg se vrši ekstrakcija, stavlja u papirnate čahure koje moraju biti dovoljno čvrste, a istovremeno moraju omogućavati protok otapala tijekom ekstrakcije (Petek, 2020). Čahura se smješta u ekstraktor gdje se postepeno puni destiliranim otapalom iz destilacijske tikvice. Kad otapalo dosegne nivo prelijevanja, sifon usisa sadržaj iz ekstraktora te se otapalo s ekstrahiranim tvarima iz uzorka prelije nazad u tikvicu. Ovaj postupak se ponavlja sve do kraja ekstrakcije (De Castro i Garcia-Ayuso, 1998).

Prednosti postupka su te što uzorak kontinuirano dolazi u doticaj s otapalom te nije potreban korak filtracije nakon prelijevanja tekućine iz ekstraktora, a s obzirom na povoljnu cijenu aparature moguće je napraviti paralelne ekstrakcije. Metoda je jednostavna i zahtjeva vrlo malo prakse. Nedostaci metode su trajanje same ekstrakcije, primjena za okoliš neprihvatljivih otapala i visoka cijena njihovog odlaganja. (De Castro i Garcia-Ayuso, 1998)

#### POSTUPAK:

Uzorak (5 g ) se važe u papirnate čahure koje se zatvore vatom kako bi se spriječio gubitak uzorka tijekom ekstrakcije. Čahura se zatim smješta u ekstraktor, središnji dio Soxhlet aparature (*Slika 4.*). Donji kraj ekstraktora spaja se s okruglom tikvicom s ravnim dnom u kojoj se nalazi nekoliko staklenih kuglica te se ulijeva otapalo, petroleter. Otapala mora biti toliko da zauzima volumen od  $\frac{3}{4}$  tikvice. Gornji kraj ekstraktora spaja se potom s vodenim hladilom kroz koji se pusti voda. Nakon spajanja svih dijelova uključuje se zagrijavanje za što se koristi pješčana kupelj. Ekstrakcija traje cca 2 sata, a kraj ekstrakcije provjerava se testom masne mrlje. Nakon završetka ekstrakcije čahura s uzorkom vadi se iz ekstraktora, a ekstraktor se ponovo spaja s tikvicom i hladilom kako bi se otapalo predestiliralo iz tikvice u ekstraktor.



Slika 4. Aparatura za Soxhlet ekstrakciju (www.researchgate.net)

### 3.2.1.2 Izolacija i čišćenje pektina iz odmašćene komine mandarine i rajčice

Ekstrakcija pektina iz odmašćene komine mandarine i rajčice izvršena je prema postupku Casas-Orozco i suradnika (2015) uz manje preinake. Kao ekstrakcijsko sredstvo korištena je 1% otopina limunske kiseline.

#### PRIPREMA KEMIKALIJA:

Limunska kiselina (1%): 20 g krute limunske kiseline prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 2000 mL, otopi i nadopuni ultračistom vodom do oznake. pH se podesi korištenjem HCl (5M) na 1,5.

Etanol (63%): 1354,84 ml 96% etanola prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 2000 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

#### POSTUPAK:

10 g odmašćene kore mandarine ili 15 g odmašćene komine rajčice prenese se u Erlenmeyerove tikvice od 500 mL i preliju prethodno pripremljenom otopinom limunske kiseline (komina mandarine s 200 ml otopine limunske kiseline, a komina rajčice s 300 ml iste otopine). Tikvice se čvrsto zatvore aluminijskom folijom te se stave u vodenu kupelj prethodno zagrijanu na

85°C, 2 sata, uz konstantno protresanje (100 o/min). Nakon 2 sata uzorci se prvo profiltriraju kroz gazu, kako bi se ubrzala filtracija uklanjanjem većih komada komina, a zatim kroz običan filter papir kako bi se u potpunosti uklonila onečišćenja (interferenti). Pritom se filtracija ekstrakta komine mandarine odvija u termostatu na 60 °C kako bi se ubrzao postupak, dok za filtraciju komine rajčice ovaj korak nije potreban jer je filtracija jednaka na 60 °C, sobnoj temperaturi i +4 °C . Pri kraju filtracije uzorci se stavljaju u hladnjak na +4 °C preko noći. Sljedeći dan uzorci se još jednom profiltriraju, korištenjem običnog filter papira, u Erlenmeyerove tikvice od 1000 mL. Zatim slijedi korak precipitacije koji uključuje dodatak 400 mL 96% etanola za pektine mandarine i 600 mL 96% etanola za pektine rajčice. Odmah pri dodatku etanola primjećuje se odvajanje pektina jer pektini nisu topljivi u etanolu. Smjese filtrata i etanola ostave se da odstoje 10 minuta, zatvore parafilmom te se stavljaju na magnetsku miješalicu 2 sata, 650 o/min. Ovaj korak provodi se kako bi se pospješilo odvajanje pektina. Radi maksimalne precipitacije nakon 2 sata miješanja uzorci se ostavljaju preko noći na +4 °C u hladnjaku (*Slika 5.*)

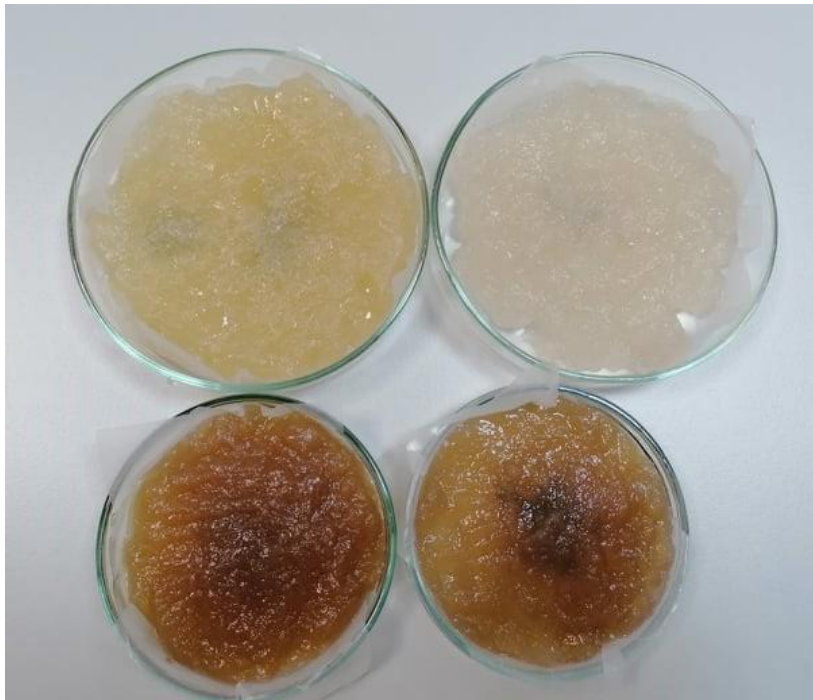


*Slika 5.* Prikaz precipitiranih pektina (rajčice lijevo, mandarina desno) nakon svih provedenih koraka ekstrakcije (snimljeno prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

Sljedeći dan slijedi korak filtracije pektina. Pritom se koriste Büchenrovi lijevci sa sinter pločicom i glatkim filter papirom. Dio pektina dodatno se ispiri 63% etanolom kako bi se uklonile preostale topljive nečistoće. Takav pektin naziva se pročišćeni pektin, a onaj pektin koji nije dodatno ispiran naziva se sirovi pektin. Obje frkacije pektina mandarine se u krajnjem koraku filtracije profiltriraju i vakuum filtracijom kako bi se odvojila što veća količina tekućine i nečistoća od pektina. Profiltrirani pektin se potom prebacuje na Petrijeve zdjelice (*Slika 6.*) na



koje je stavljen parafilm radi lakšeg uklanjanja nakon sušenja te se prekriva staničevinom i ostavlja na sušenju na sobnoj temperaturi 2,3 dana. Nakon što se potpuno osuši, pektin se skida s parafilma, važe i usitnjava u mlincu radi homogenizacije te sprema do daljnje uporabe.



*Slika 6.* Prikaz izoliranih pektina prije koraka sušenja. Tamniji pektini pripadaju pektinima rajčice, a svjetliji mandarine. Lijevi su sirovi, a desni pročišćeni pektini (snimljeno prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

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

U istraživanju je korišten prethodno pripremljen ekstrakt komine masline dobiven postupkom opisanim u nastavku (Albahari et al., 2018)

Komina masline uzeta je iz dvofaznog mlina nakon proizvodnje maslinovog ulja. Svježa komina se zamrzava na - 20 °C kako bi se spriječio raspad vrijednih sastavnica. S ciljem uklanjanja vode uzorak se suši u termostatu (24 sata / 60°C) na velikim Petrijevim zdjelama, a zatim usitnjava u tarioniku i mlincu te prosijava kroz sito Ø 0,8 mm kako bi nastao homogen uzorak. Korištenjem Soxhlet uređaja komina se odmastiti. Slijedi korak ekstrakcije u vodenoj kupelji (2 sata / 70 °C / 110 rpm / 60% etanol), a zatim filtriranje i alikvotiranje u tikvice za uparavanje. Na 50 °C i ~ 60 mbar proveden je korak uparavanja na rotavaporu; u tom koraku

se uklanja etanol koji onemogućava smrzavanje uzoraka na - 20 °C. smrznuti ekstrakti podvrgavaju se postupku liofilizacije tijekom 48 sati.

### 3.2.3 Zelena sinteza nanoselena

Sinteza nanoselena provodi se redukcijom Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> uz reducens, L-askorbinsku kiselinu uz prisutnost različitih sredstava za oblaganje kako je prikazano u Tablici 2. Nakon sinteze reakcijska smjesa se pročišćava postupkom dijalize kako bi se sintetizirani nanoelen izdvojio iz reakcijske smjese. Kao inkapsulacijsko sredstvo u pripremi uzorka sa ekstraktom komine masline korišteni su sintetski polivinilpirolidon (PVP) i polisorbit (PS). Kontrolni uzorci pripremljeni su procesom kemijske sinteze korištenjem PS i PVP-a kao inkapsulacijskih sredstava. Uzorci niže koncentracije nanoselena po potrebi se ukoncentriravaju uparavljem na rotavaporu.

Tablica 2. Sastav reakcijskih smjesa korištenih u zelenoj sintezi nanoselena

Oznaka	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (0,1M)	L-askorbinska	PRr (0,1%) / mL	PRp (0,1%) / mL	PMr (0,1%) / mL	PMP (0,1%) / mL	EKM (1%)/ mL	PVP (1%)/ mL	PS (10%)/ mL	voda/ mL	Vtot/ mL
bnSeRr	1	1 (1M)	7,5							19,5	29
bnSeRp	0,5	0,5 (1M)		2,9						10,6	14,5
bnSeMr	1	1 (1M)			7,5					19,5	29
bnSeMp	0,5	0,5 (1M)				2,9				10,6	14,5
bnSePVP-EKM	0,33	3,3 (0,1M)					5	3		18,37	30
bnSePS-EKM	0,35	1,7 (0,1M)					5		0,08	22,87	30
nSePVP	0,5	0,5 (1M)						1,45		12,05	14,5
nSePS	0,35	1,7 (0,1M)							0,08	27,87	30

\*nSe-nanoselen; bnSe-biogeni nanoselen; EKM-ekstrakt komine masline; PVP-polivinil pirolidon; PS-polisorbit; PRr-sirovi pektini rajčice; PRp-pročišćeni pektini rajčice; PMr- sirovi pektini mandarine; PMP-pročišćeni pektini mandarine

## PRIPREMA KEMIKALIJA:

Polivinilpirolidon/PVP (1%): 250 mg PVP-a, prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

Tween 20 (10%): Pomoću mikropipete odvaži se 100 mL Tween 20 u ependorf tubu te se doda ultračiste voda do 1000 mL. Tuba se zatvori i homogenizira na vortex miješalici.

L-askorbinska kiselina (0,1M): 0,3524 g krute askorbinske kiseline prenosi se u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL, nadopuni ultračistom vodom do oznake i promućka.

L-askorbinska kiselina (1M): 3,524 g krute askorbinske kiseline prenosi se u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL nadopuni ultračistom vodom do oznake i promućka.

Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0,1M): 172,9 mg krutog Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

Ekstrakt komine masline/EKM (1%): Za pripremu 30 mL ekstrakta potrebno je izvagati 300 mg ekstrakta komine masline te ju otopiti u 30 mL ultračiste vode. Neposredno prije sinteze nanoselena EKM je potrebno profiltrirati kroz HPLC filter.

Pektini (0,1%): Priprema otopina svih vrsta pektina (sirovi pektin rajčice, pročišćeni pektin rajčice, sirovi pektin mandarine, pročišćeni pektin mandarine) izvodi se na isti način. Važe se 50 mg pektina u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL te se dodaje još 50 mL ultračiste vode. Tako pripremljena otopina stavlja se na magnetsku miješalicu (1200 o/min) preko noći. Nakon toga otopine se prebacuju u Falcon epruvete i stavljaju u hladnjak na +4°C do korištenja.

## POSTUPAK:

### ► *Sinteza uzoraka nanoselena:*

Uzorci nanoselena pripremaju se dodatkom reagensa prikazanih u *Tablici 2.* te prema sljedećem napatku.

Uzorci s dodatkom ekstrakta komine masline (EKM) pripremaju se dodatkom ultračiste vode i inkapsulacijskog sredstva koji uključuje PS (10%) ili PVP (1%) u reakcijsku posudu nakon čega se uzorci miješaju 15 minuta na magnetskoj miješalici. Potom se dodaju L-askorbinska kiselina (0,1 M) i EKM (1%) te na kraju kap po kap Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0,1 M) brzinom 1 kap/2 sekunde pri čemu otopina mijenja boju u narančasto. Po dodatku Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> otopina se ostavlja na magnetskoj miješalici još 20 minuta.

Uzorci nanoselena s inkapsulirani pektinom pripremaju se dodatkom ultračiste vode i pektina (0,1%) u reakcijsku posudu te se uzorci miješaju 15 minuta na magnetskoj miješalici. Nakon toga se dodaje L-askorbinska kiselina (1M) te na kraju kap po kap  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0,1M) brzinom od cca 1 kap/2 sekunde pri čemu se otopina boja narančasto (Slika 7.). Dodatkom  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  otopina se ostavlja na magnetskoj miješalici još 20 minuta. Zbog slabe topljivosti pektina koristila se askorbinska kiselina veće koncentracije što je pritom zahtijevalo i veću količinu vode.



Slika 7. Narančasto obojenje nakon dodatka selenita pri sintezi nanočestica selen (snimljeno prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

► Čišćenje uzoraka nanoselena dijalozom:

Dijalizacijska membrana (MWC membrane je 14 000 što znači da membrana zadržava čestice veće od 14 000 Da) reže se na veličine od 14 cm. Preko noći se namoči u ultračistoj vodi uz mijenjanje vode barem 3 puta kako bi se uklonili ostaci glicerola. Membrane se na jednom kraju zatvaraju štipaljkom te se u svaku od njih prebacuje novosintetizirana otopina nanoselena te se zatvara štipaljkom i na drugom kraju. Potom se svaka membrana stavlja u veliku čašu (zapremnine 1000 mL) punu ultračiste vode. Membrane se zakače za rub čaše tako da pritom ne dodiruju stijenke čaše te su jednako udaljene od stijenki sa svih strana. Membrane se potom vraćaju na magnetsku miješalicu preko noći s tim da je vodu potrebno promijeniti najmanje 3 puta. Prvi put nakon 30 minuta - 3 sata, drugi put nakon 4 - 5 sati i treći put sljedeći dan. Nakon postupka dijalize otopine nanoselena spremaju se u hladnjak na + 4 °C do daljnje uporabe.

► Uparavanje uzoraka na rotavaporu:

Usljed niže koncentracije  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  uzorci nSePS, bnSePVP-EKM, bnSePS-EKM prebacuju se u tikvice s ravnim dnom te se uparavaju na rotavaporu na volumen od 10 mL. Uzorci se uparavaju na temperaturi od 60 °C i tlaku koji se spušta od 300 – 400 Mbar do 100 mbar jer je pri nižem tlaku brže uparavanje.

### 3.2.4 Ispitivanje gastrointestinalne stabilnosti nanoselena

*In vitro* simulacija gastrointestinalne digestije provedena je prema modificiranoj INFOGEST metodi Brodkorb-a i suradnika (2019). Postupak je podijeljen u dvije faze, gastičnu i intestinalnu koje su se provodile po 2 sata na 37°C. Sve kemikalije i reagense je potrebno zagrijati na 37°C prije uporabe. Svi uzorci pripremani su na isti način.

#### PRIPREMA KEMIKALIJA:

NaHCO<sub>3</sub> (1M): 8,4 g krutog NaHCO<sub>3</sub> prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

NaCl (2M): 5,85 g krutog NaCl prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

KCl (0,5M): 1,865 g krutog KCl prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5M): 1,36 g krutog K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (0,3M): 0,882 g krutog CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (0,15M): 0,61 g krutog MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

CH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> (0,5M): 0,7904 g krutog CH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL, zagrije kako bi se krutina otopila i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

Priprema HCl (6M): 9,9368 mL 37% HCl-a razrijedi se ultračistom vodom do 20 mL u preciznoj odmjernoj tikvici s time da se u tikvicu prvo dodaje manja količina vode, zatim kiselina pa se do kraja tikvica nadopuni ultračistom vodom do oznake.

NaOH (1M): 4,0 g krutog NaOH prenese se u preciznu odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake.

Priprema 500 mL (x1,25 koncentrata) simulirane gastične tekućine (SGF) i simulirane intestinalne tekućine (SIF) prikazana je u *Tablici 3*.

Tablica 3. Priprema 1,25x koncentrata SGF i SIF

	SGF	SIF
	pH 3	pH 7
Stock otopina	V / mL	V/mL
KCl	8,625	8,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,125	1
NaHCO <sub>3</sub>	15,625	53,125
NaCl	14,75	12
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,5	1,375
CH <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	0,625	-
HCl (6M)	1,625	0,875

Gore navedene količine otopina soli dodaju se u odmjernu tikvicu od 500 mL, homogeniziraju te im se podese pH pomoću lužine (1M NaOH) ili kiseline (1M HCl) i nadopune se ultračistom vodom do oznake,. Pripremljene otopine prenose se u Falcon kivete od 50 mL te ih se do pokusa pohranjuje na temperaturu od -20°C. Čuvanje otopina na toj temperaturi omogućava njihovu stabilnost i do godinu dana.

#### POSTUPAK:

##### ► *Gastrična faza digestije:*

U staklene epruvete dodaje se 600 µL uzorka (ili vode u slučaju slijepe probe/sp). Zatim se dodaje 2275 µL SGF otopine, 1,25 µL otopine CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (0,3M), 50 µL HCl (6M). Potom se mjeri pH i podešava na 3 ukoliko je potrebno, a zatim se uzorcima dodaje još 174 µL ultračiste vode. Epruvete se zatvaraju s ubrušenim čepom i ovijaju parafilmom. Epruvete se stavljaju na multi-rotator (recipročno miješanje 90°, okomito usmjerenje epruvete), a zatim na 2 sata i 37 °C u inkubator na inkubaciju.

Uz gore navedene uzorke na inkubaciju u istim uvjetima stavljaju se i nedigerirani uzorci koji sadrže 600 µL uzorka i 2500 µL ultračiste vode koja predstavlja volumen svih sastavnica gastrične faze dodanih digeriranim uzorcima.

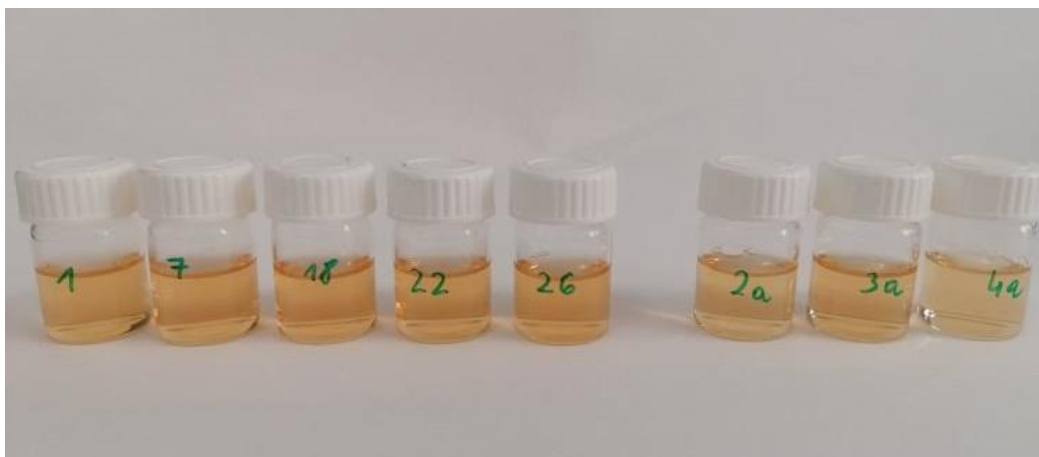
► *Intestinalna faza digestije:*

Nakon 2 sata inkubacije uzorci se vade iz inkubatora i dodaju im se sastavnice intestinalne faze. Svakoj reakcijskoj smjesi nakon gastrične digestije dodaje 4000  $\mu\text{L}$  SIF otopine, 10  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  (0,3M), 37,5  $\mu\text{L}$  NaOH (1M) nakon čega je potrebno provjeriti pH i podesiti ga na 7. Na kraju se dodaje 953  $\mu\text{L}$  ultračiste vode te se epruvete opet zatvaraju ubrušenim čepom i ovijaju parafilmom. Tako pripremljene smjese stavljaju se na multi-rotator (recipročno miješanje  $90^\circ$ , okomito usmjerenje epruvete) pa u inkubator na 2 sata i  $37^\circ\text{C}$  (*Slika 8.*).

Paralelno s prethodno pripravljenim uzorcima, nedigeriranim uzorcima se dodaje 5000  $\mu\text{L}$  ultračiste vode, koja predstavlja ukupni volumen svih sastavnica intestinalne faze, te se stavljaju u inkubator na 2 sata,  $37^\circ\text{C}$  (*Slika 9.*).



*Slika 8.* Prikaz uzoraka i slijepe probe nakon digestije (snimljeno prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)



*Slika 9.* Prikaz nedigeriranih uzoraka nakon inkubacije uz SGF i SIF (snimljeno prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada)



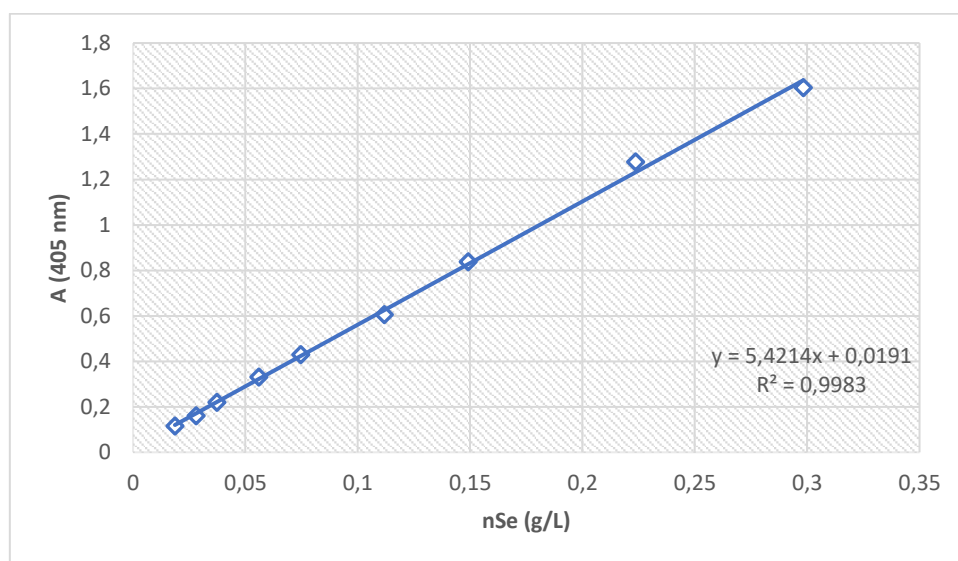
### 3.2.5 Spektrofotometrijsko određivanje nanoselena

Apsorpcijska spektrofotometrija je metoda koja mjeri količinu apsorbiranog svjetla od strane materije mjereći pritom intenzitet svjetlosti prije i nakon prolaska zrake svjetlosti kroz otopinu. (www.chem.libretexts.org). Tijekom postupka korištena je UV/Vis spektrofotometrija koja se temelji na praćenju apsorbancije u ovisnosti o valnoj duljini zračenja koje je prošlo kroz ispitivani uzorak. Apsorpcija zračenja prati se u UV (200-380nm) i vidljivom (380-780nm) dijelu spektra. Mjerenje nepoznate koncentracije u uzorku moguć je zahvaljujući Beer-Lambertovom zakonu:

$$A = c \times l \times \varepsilon$$

A-apsorbancija pri danoj valnoj duljini; c-molarna koncentracija otopine (mol/dm<sup>3</sup>); l-duljina uzorka kroz koji prolazi svjetlost (cm); ε-molarni apsorpcijski koeficijent (dm<sup>3</sup>/mol cm)

POSTUPAK:



Slika 10. Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nanoselena (poznate ishodne koncentracije selena uz pretpostavku 100%-tne redukcije Se<sup>4+</sup> u Se<sup>0</sup>)

Nakon postupka digestije provodi se spektrofotometrijsko određivanje nanoselena. Digerirani i nedigerirani uzorci prenose se u triplikatu u mikrotitarsku pločicu koja se stavlja u UV/Vis spektrofotometar. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 405 nm na 37°C uz protresanje. Baždarni pravac (Slika 10.), izrađen na temelju mjerenja apsorbancije otopina poznatih koncentracija selenita uz pretpostavku 100%-tnog iskorištenja procesa redukcije u Se<sup>0</sup> i sinteze nanoselena.

### **3.2.6 Određivanje raspodjele veličine čestica nanoselena**

Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) je široko rasprostranjena metoda koja omogućava razumijevanje distribucije veličina, aglomeraciju i posljedično stabilnost molekula u otopini. Na temelju Brownovog gibanja čestica u otopini moguće je procijeniti veličinu molekula. Brownovo gibanje predstavlja nasumično gibanje molekula u otopinu koje su bombardirane molekulama otapala koje ih okružuju. Veće čestice gibaju se sporije dok se male gibaju brže uslijed sudara s molekulama otapala. Tijekom mjerenja bitno je znati točnu temperaturu, koja mora biti konstantna, jer viskoznost otopine ovisi o temperaturi. Bitna je stabilnost temperature u uzorku jer konvekcija struje može uzrokovati neslučajne pokrete koji mogu interferirati u ispravnoj interpretaciji veličine čestica (Orešković, 2015). Uređaj kojim se mjeri raspodjela veličina čestica metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti je zetasizer.

#### **POSTUPAK:**

Uzorci digeriranih i nedigeriranih uzoraka vortexiraju se u svrhu homogeniziranja neposredno prije mjerenja. Mjerenje se vrši pri 25°C. Alikvoti uzorka prenose se u kivetu koja se potom stavlja u zetasizer pri čemu se mjeri raspodjela čestica.

### 3.2.7 Određivanje zeta-potencijala nanoselena

Elektroforetsko raspršenje svjetlosti (ELS) je metoda koja se temelji na mjerenju elektroforetske mobilnosti molekule u otopini ili čestice u suspenziji. Nabijena čestica giba se u tekućini pod utjecajem električnog polja. Nju privlači suprotno nabijena elektroda te joj se na tom putu suprostavlja viskoznost. Pri uravnoteženju tih dviju sila dolazi do konstantnog gibanja čestica. Elektroforetska mobilnost predstavlja brzinu čestice u električnom polju. Na nju utječu zeta-potencijal, dielektrična konstanta, viskoznost i jakost primijenjenog polja. Zeta-potencijal indikator je stabilnosti čestica. Ukoliko je on jako pozitivan ili jako negativan čestice se odbijaju, ali ako je on niske vrijednosti nema sile koja sprječava zbližavanje čestica pa dolazi do agregacije. Korištenjem Henryjeve jednadžbe moguće je izračunati zeta potencijal čestice preko njezine elektroforetske mobilnosti (Šafarik, 2018):

$$U_E = 2\varepsilon\zeta f(Ka)3\eta$$

$U_E$  - elektroforetska mobilnost;  $\varepsilon$  - dielektrična konstanta;  $\zeta$  - zeta potencijal;  $f(Ka)$  - Henryjeva funkcija;  $\eta$  - koeficijent viskoznosti

#### POSTUPAK:

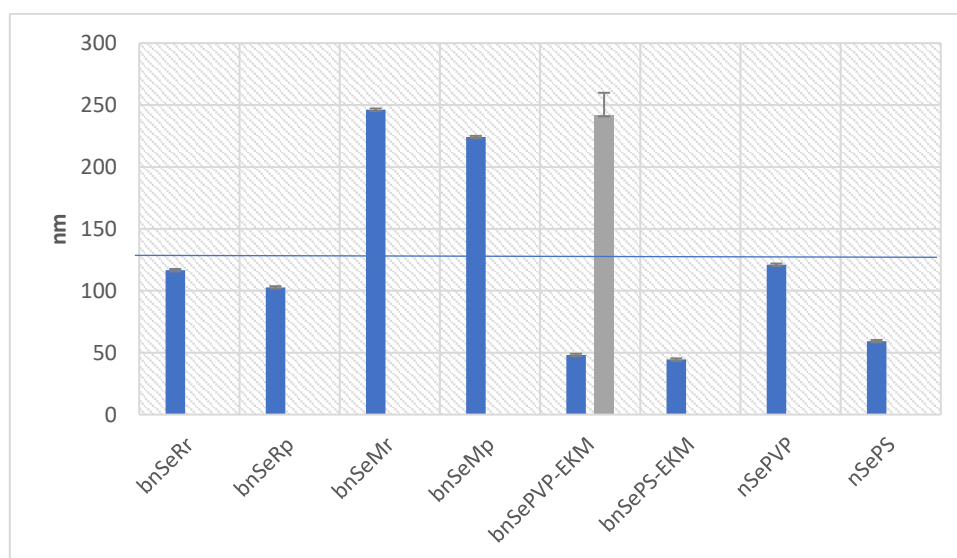
Uzorci digeriranih i nedigeriranih uzoraka vortexiraju se u svrhu homogeniziranja neposredno prije mjerenja. Mjerenje se vrši pri 25°C. Alikvot pojedinog uzorka prenosi se u kivetu koja se potom stavlja u zetasiser pri čemu se mjeri zeta potencijal.

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 REZULTATI

#### 4.1.1 Karakterizacija nanočestica selena prije *in vitro* gastrointestinalne digestije

► *Raspodjela veličina čestica:*



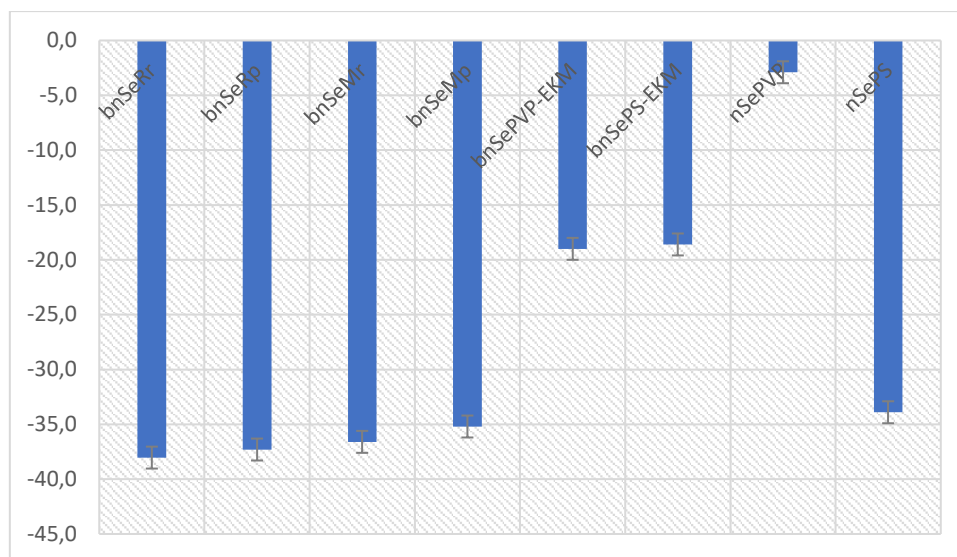
Slika 11. Prikaz raspodjele veličina čestica uzoraka prije digestije

Veličina nanočestica od 1-100 nm doprinosi optimalnoj bioraspoloživosti nakon probave. Mjerenjem raspodjele čestice prije (Slika 11.) i nakon simulacije probave moguće je utvrditi njihovu stabilnost u gastrointestinalnom sustavu i pretpostaviti bioraspoloživost.

Sve nanočestice, osim nanočestica selena iz uzorka bnSePVP-EKM (stabiliziranih polivinil pirolidonim i ekstraktom komine masline), prije procesa digestije pokazuju unimodalnu raspodjelu veličina. Kod čestica iz uzorka bnSePVP-EKM javljaju se dvije frakcije čestica različitih veličina pri čemu je 17,9 % čestica veličine 241,8, a 82,1 % veličine 48,1 nm. Nanočestice iz uzorka bnSeMp i bnSeMr, koji sadrže pročišćene i sirove pektine mandarine, veličine su 224,1 nm i 246,2 nm čine pokazuju lošiju stabilnost jer čestice već i prije digestije aglomeriraju. Najmanjima su se pokazale čestice uzorka bnSePS-EKM, veličine 44,4 nm, i nSePS, veličine 59,3 nm, što bi se moglo pripisati korištenju sintetskog polisorbitnog *coatinga*.

Usljed takve raspodjele veličina očekuje se i najveća bioraspoloživost istih. Prosječnu veličinu čestica od ~ 100 nm pokazuju uzorci bnSeRr, bnSeRp i nSePVP stoga je za očekivati dobru bioraspoloživost nanoselena iz tih uzoraka. Stvarna veličina čestica zapravo je i manja jer se korištenjem DLS metode pri mjerenju raspodjele veličina mjeri i vodeni sloj koji okružuje čestice pa je veličina čestica prividno veća.

► *Zeta potencijal čestica:*

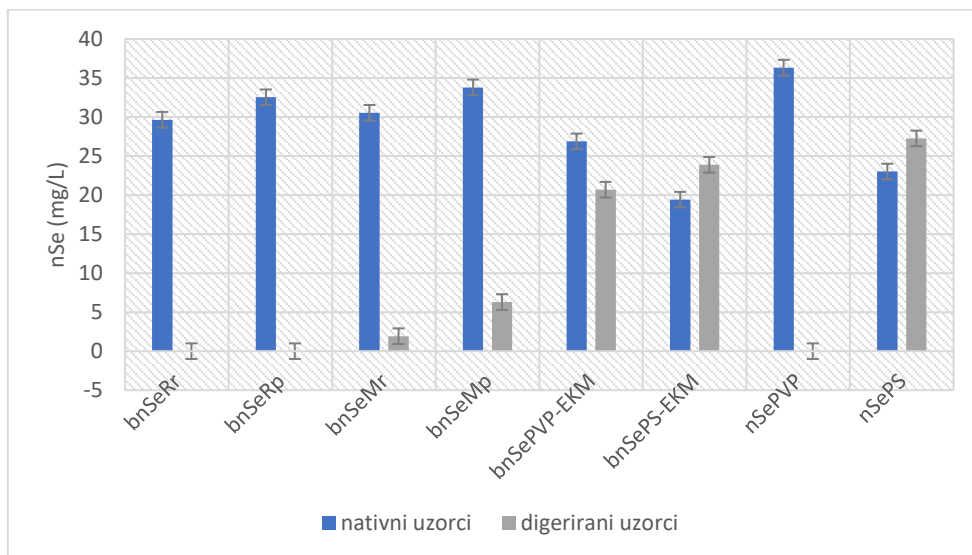


Slika 12. Prikaz zeta potencijala uzoraka prije digestije

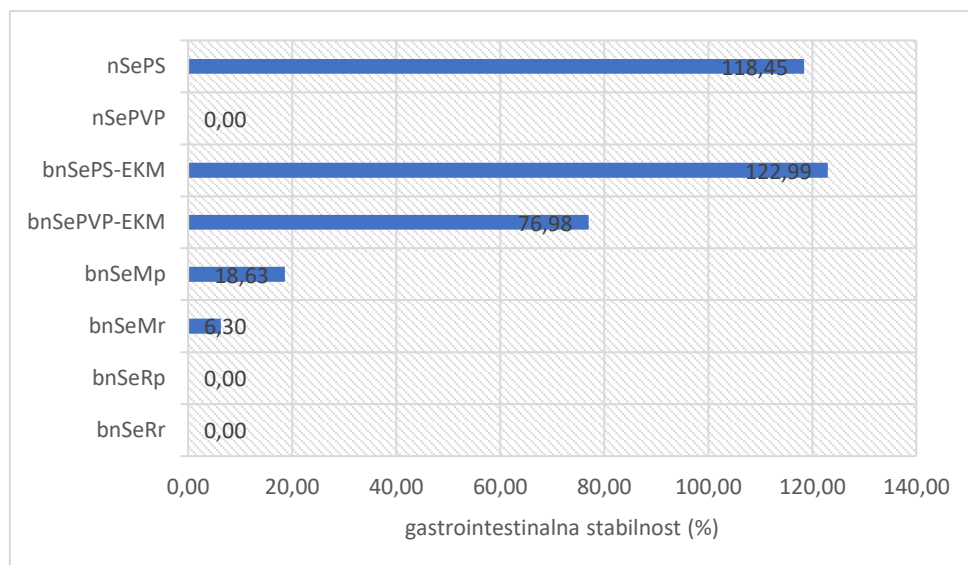
Čestice sa zeta potencijalom većim od  $\pm 30$  mV pokazuju stabilnost u suspenziji. Slika 12. pokazuje zeta potencijale čestica nanoselena prije procesa gastrointestinalne digestije. Čestice uzoraka koje pokazuju manje negativan zeta potencijal od 30 mV su bnSePVP-EKM, bnSePS-EKM pri čemu njihov zeta potencijal iznosi -19,0 i -18,6 mV. Uzorak nSePVP pokazuje još niži zeta potencijal od -2,9 mV čime bi se moglo pretpostaviti da su ovakve čestice nestabilne. Ipak, niža vrijednost ovih zeta potencijala ne znači nužno da su sustavi nestabilni jer je moguće da je uslijed adsorpcije polimera na površinu čestica postignuta sterička stabilizacija koja sprječava kontakt među česticama. Najviši zeta potencijal od -38 mV pokazuje uzorak bnSeRr, dok su svi ostali uzorci u rasponu od -33 mV do -37,5 mV.

## 4.1.2 Nanočestice nakon gastrointestinalne digestije

► UV/VIS spektrofotometrija:



Slika 13. Koncentracije nanoselena u reakcijskoj smjesi prije i nakon digestije



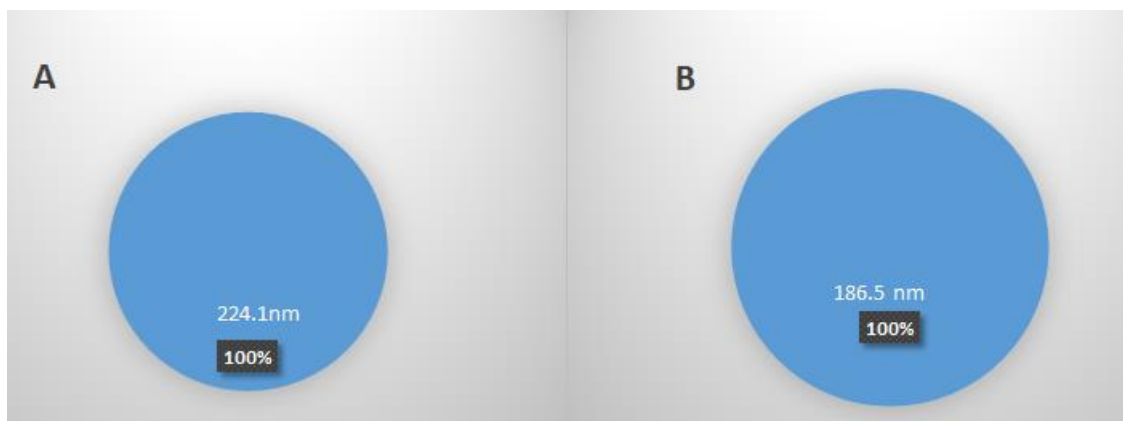
Slika 14. Gastrointestinalna stabilnost nanoselena izražena kao postotak nanoselena nakon GIT digestije, u odnosu na početne koncentracije nanoselena

Mjerenjem apsorbancije reakcijskih smjesa na 405 nm određene su koncentracije različitih formulacija nanoselena u uzorcima prije i poslije digestije (Slika 13.) kako bi se procijenila njegova stabilnost tijekom procesa probave (Slika 14.). Dobiveni podaci samo okvirno ukazuju

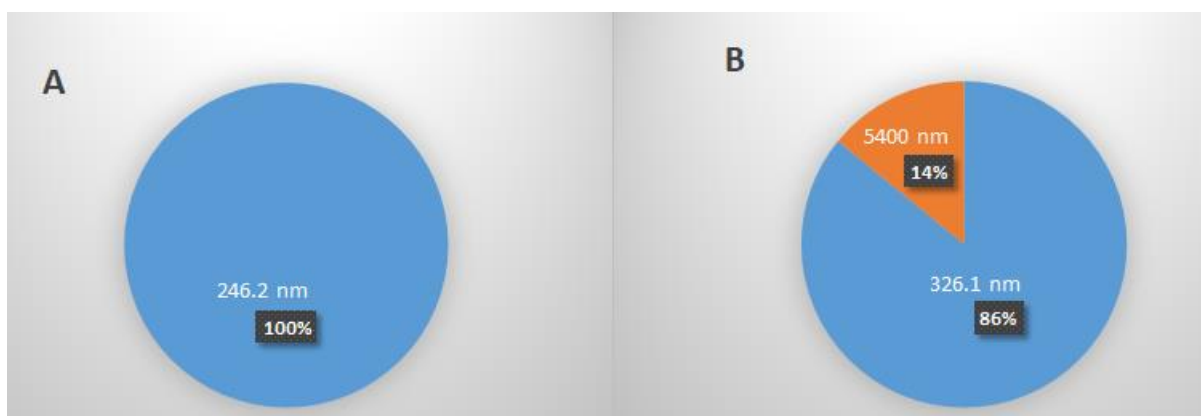
na količinu nanoselena u reakcijskoj smjesi jer tijekom procesa probave čestice aglomeriraju pa im se smanjuje broj, a tako prividno opada i njihova koncentracija. Dakle, smanjenje apsorbancije nije nužno posljedica oksidacije  $\text{Se}^0$  već može biti posljedica promjene morfoloških karakteristika nanoSe, ali u svakom slučaju ukazuju na promjene odnosno nestabilnost sustava. Na temelju toga vidljivo je da su koncentracije uzoraka bnSeRp, bnSeRr i nSePVP pale na 0 kao što ukazuje na lošu gastrointestinalnu stabilnost navedenih nanočestica. Uzorci nanoselena obloženi pektinima rajčice (bnSeMr i bnSeMp) pokazuju nisku stabilnost od 6,3% i 8,63%. Prosječnu stabilnost od 76,98% pokazuje uzorak bnSePVP-EKM, a najbolju stabilnost na temelju apsorbancije možemo procijeniti za uzorke nSePS (118,45%) i bnSePS-EKM (122,99%) čemu opet može biti razlog prisutnost polisorbata kao sintetskog *coatinga*.

► *Raspodjela veličina čestica:*

Korištenjem metode dinamičkog raspršenja svjetlosti prati se promjena raspodjela veličina čestica prije i poslije digestije.



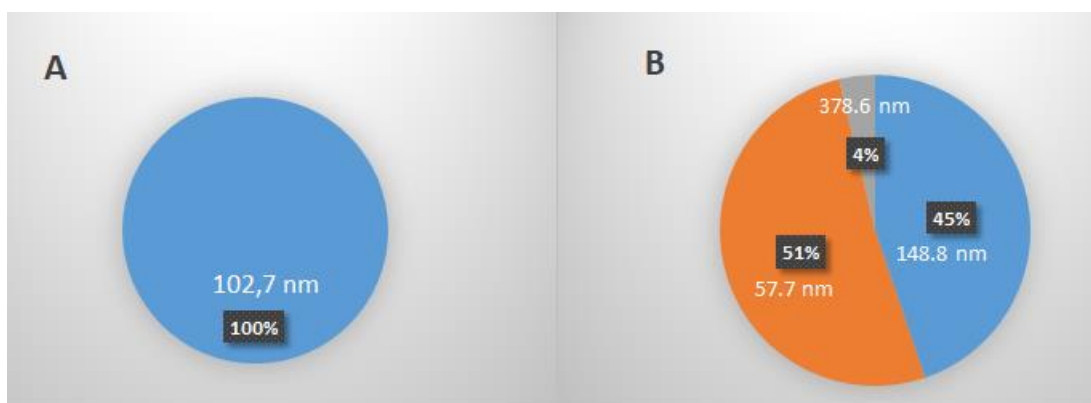
*Slika 15.* Prikaz raspodjele veličina čestica nanoselena u uzorku bnSeMp prije (A) i nakon digestije (B)



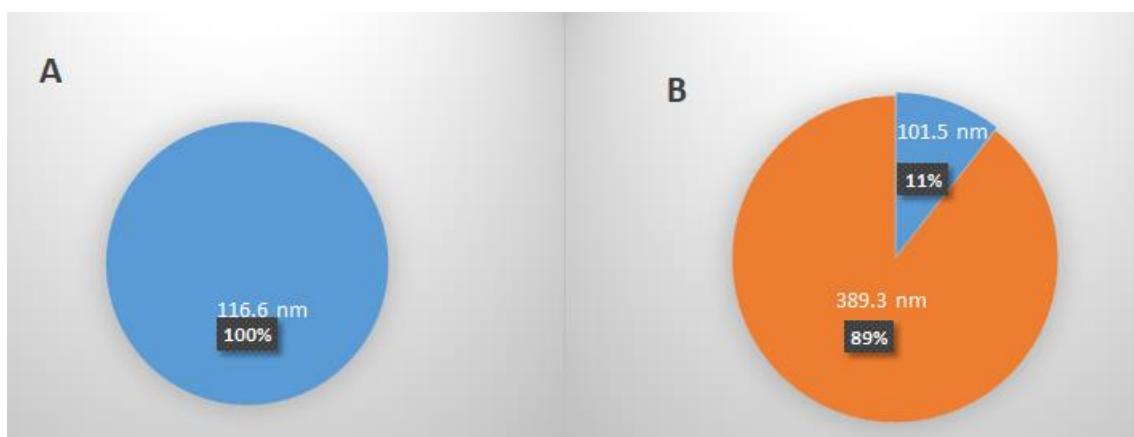
*Slika 16.* Prikaz raspodjele veličina nanoselena u uzorku bnSeMr prije (A) i nakon digestije (B)

*Slika 15.* prikazuje uzorak nanoselena s pročišćenim pektinima mandarine (bnSeMp) koji pokazuje unimodalnu raspodjelu veličina čestica prije i poslije digestije. Pritom dolazi do smanjenja čestica, ali su novonastale čestice veće od 180 nm što bi moglo narušiti njihovu optimalnu bioraspodjelu. *Slika 16.* prikazuje uzorak nanoselena sa sirovim pektinima mandarine (bnSeMr) kod kojeg tijekom digestije dolazi do aglomeracije čestica, a samim time i povećanja čestica što je rezultiralo pojavom frakcije od 14 % čestica koje su prešle u mikropodručje.



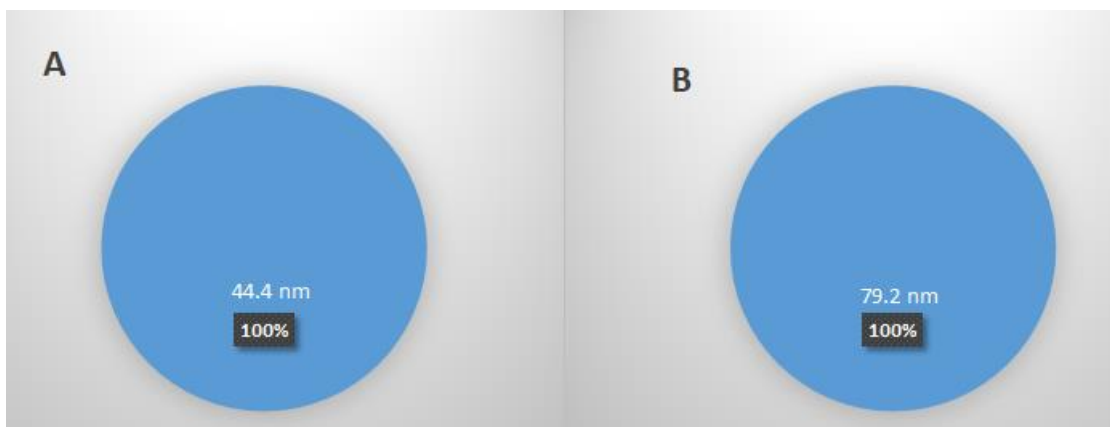


*Slika 17.* Prikaz raspodjele veličina čestica nanoselena u uzorku bnSeRp prije (A) i nakon digestije (B)

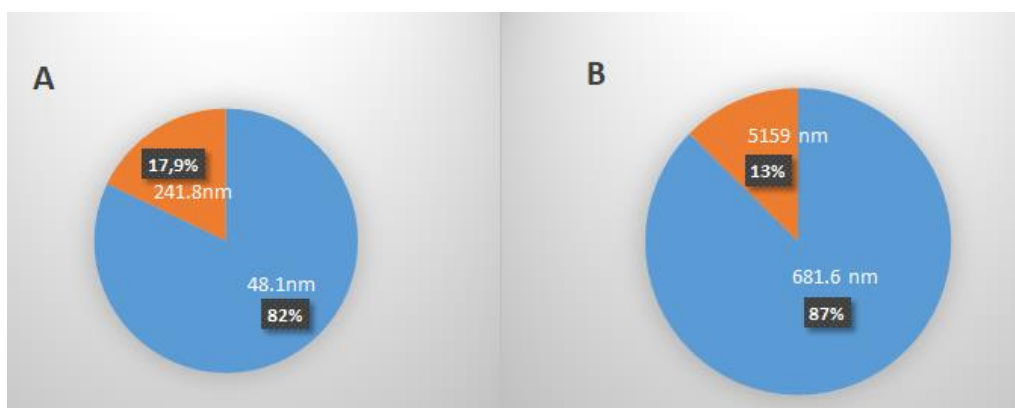


*Slika 18.* Prikaz raspodjele veličina nanoselena u uzorku bnSeRr prije (A) i nakon digestije (B)

Dijagrami uzorka nanoselena s pročišćenim pektinima rajčice (bnSeRp) pokazuju nestabilan sustav (*Slika 17.*). Prije digestije veličina čestica iznosila je optimalnih 102,7 nm, a nakon digestije dolazi do promjene u njihovim veličinama pri čemu najveća frakcija koju čini 51 % nanočestica, sadrži raspadnute čestice, a frakcija od 4 % sadrži aglomerirane nanočestice. *Slika 18.* prikazuje dijagrame uzoraka nanoselena sa sirovim pektinima rajčice (bnSeRr). Na njima je vidljiv nestabilan sustav kod kojeg većina čestica aglomerira.



Slika 19. Prikaz raspodjele veličina čestica nanoselena u uzorku bnSePS-EKM prije (A) i nakon digestije (B)

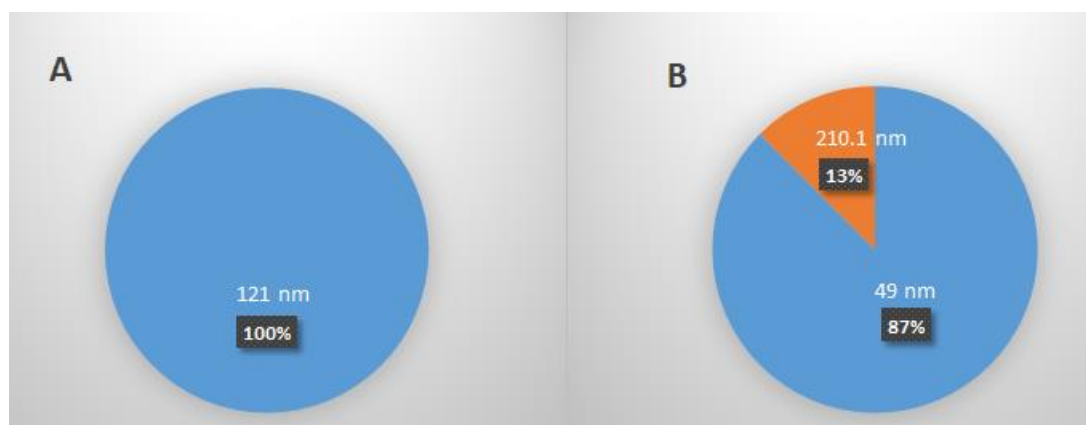


Slika 20. Prikaz raspodjele veličina čestica nanoselena u uzorku bnSePVP-EKM prije (A) i nakon digestije (B)

Uzorak nanoselena s polisorbatom i ekstraktom komine masline (bnSePS-EKM) pokazuje unimodalnu raspodjelu čestica prije i nakon digestije (Slika 19.). Pritom su čestice nakon digestije nešto veće nego one prije digestije, ali i dalje manje od 100 nm iz čega se može pretpostaviti njihova stabilnost i dobra bioraspoloživost. Uzorak nanoselena s polivinil pirolidonom i ekstraktom komine masline (bnSePVP-EKM) jedini je uzorak koji nije imao početnu unimodalnu raspodjelu čestica (Slika 20.). Uz to dolazi do aglomeracije čestica nakon digestije pri čemu frakcija od 13 % nanočestica prelazi u mikropodručje.



Slika 21. Prikaz raspodjele veličina čestica nanoselena u uzorku nSePS prije (A) i nakon digestije (B)



Slika 22. Prikaz raspodjele veličina čestica nanoselena u uzorku nSePVP prije (A) i nakon (B) digestije

Slika 21. uzorka nanoselena s polisorbatom (nSePS) prikazuje unimodalnu raspodjelu veličina čestica prije i nakon digestije. Pritom u manjoj mjeri dolazi do aglomeracije čestica što rezultira njihovim blagim povećanje, ali i dalje u granicama u kojima bi se čestice mogle smatrati stabilne jer ne prelaze veličinu od 100 nm. Kod uzorka nanoselena s polivinil pirolidonom (nSePVP) dolazi do raspada i aglomeracije čestica (Slika 22.), pri čemu se njihova veličina smanjuje, odnosno povećava za duplo.

## 4.2 RASPRAVA

Mjerenjem apsorbancije uzorka procjenjuje se koncentracija nanoselena i stabilnost uzorka, dok je korištenjem metode dinamičkog raspršenja svjetlosti i praćenjem raspodjela veličina čestica nanoselena prije i poslije digestije moguće stvarno ustanoviti stabilnost sustava.

Daljnjom raspravom pokušati će se objasniti može li se na temelju mjerenja apsorbancije UV/Vis spektrofotometrijom, kao izrazito dostupnom metodom analize nanoselena zapravo odrediti njegova stabilnost i koncentracija. Mjerenje zeta potencijala koristi se također koristi za određivanje stabilnosti sustava pri čemu se čestice s potencijalom većim od  $\pm 30$  mV smatraju stabilne. Čestice s manjim zeta potencijalom ne predstavljaju nužno nestabilan sustav. Niske vrijednosti potencijala mogu biti nadoknađene steričkom stabilizacijom koja nastaje uslijed adsorpcije polimera na površinu čestice pri čemu im se na taj način onemogućava kontakt i aglomeracija. Sve ove parametre potrebno je uzeti u obzir kod donošenja konačnog zaključka o stabilnosti sustava.

Uz određivanje stabilnosti sustava bitno je uzeti u obzir i bioraspoloživost čestica nakon digestije koja se procjenjuje na temelju veličine čestica. Na temelju mnogih radova, čestice veličine  $< 100$  nm pokazuju dobru bioraspoloživost nakon digestije. Čestice veće od toga ne znače nužno lošu bioraspoloživost jer se tijekom mjerenja treba uzeti u obzir i doprinos vodenog sloja oko molekule koji može prividno povećati promjer čestice. Navedeni omotač nema utjecaj na kasniju apsorpciju nanočestica.

Prilikom mjerenja vidljivo je da uzorci bnSePS-EKM i nSePS pokazuju korelaciju u određivanju stabilnosti praćene preko mjerenja apsorbancije i raspodjele veličina čestica. Oba uzorka pokazuju stabilnost  $> 100\%$  preračunatu iz koncentracija nakon mjerenja apsorbancije uzoraka, a pritom se mjerenjem raspodjele veličina čestica pokazuju stabilnima jer zadržavaju unimodalnu raspodjelu i veličina im ne prelazi 86 nm čak niti nakon digestije. Na temelju zapažanja mogu se pretpostaviti stabilnost i dobra bioraspoloživost nanoselena iz uzoraka. Uz to, potencijal uzorka nSePS prije digestije negativniji je od - 30 mV, što bi trebalo značiti da je sustav stabilan. Naravno na taj parametar kao i samu stabilnost može utjecati promjena pH tijekom procesa digestije uslijed koje može doći do promjene zeta potencijala na površini čestica. Uzrok stabilnosti ovih uzoraka može biti polisorbit koji kao sintetsko oblagajuće sredstvo pokazuje povoljnu i konstantnu stabilizaciju molekula uslijed svoje uniformnosti i definiranog sastava. Pritom stabilizaciji uzorka bnSePS-EKM pridonosi i ekstrakt komine

masline koji uz to pospješuje dopremanje polifenolnih sastavnica u organizam. Sam ekstrakt komine masline sadrži manji udio pektinske frakcije što bi moglo povećati stabilnost takvog sustava.

Sukladno njima, uzorci bnSeRp, bnSeRr, nSePVP kojima je koncentracija, mjerena preko apsorbancije, nakon digestije prividno pala na 0, a uslijed čega je i njihova stabilnost procijenjena 0%, pokazuju promjenu u raspodjeli veličina pri čemu čestice aglomeriraju ili se raspadaju na čestice upola manje od njihove početne veličine. Aglomeracija čestica dovodi do smanjenja broja čestica nanoselena, ali njegova koncentracija u uzorku ostaje stalna. Spektrofotometrijsko mjerenje iz tog razloga pokazuje nedostatke jer se smanjenjem broja čestica mijenja apsorbancija uslijed koje daljnjim izračunima i sama koncentracija u uzorcima prividno opada. Temeljem ovih podataka može se zaključiti da uporaba pektina rajčice nikako ne doprinosi stabilnosti sustava, kao ni polivinil pirolidon koji je za razliku od navedenih pektina sintetsko oblagajuće sredstvo definiranog sastava. Uzorak bnSePVP-EKM od početka pokazuje nestabilnost jer jedini od početka nema unimodalnu raspodjelu veličina čestica. Nakon digestije i mjerenja raspodjele veličina ta teza je i potvrđena jer su čestice aglomerirale s time da je određena frakcija prešla i u mikrometarsko područje. Ove rezultate nije moguće povezati sa stabilnošću koja je izračunata preko apsorbancije jer ona iznosi 76,98 %, a veličine čestica nakon digestije povećale su se za više od 10 puta. Uzorak nSePVP i prije digestije ima zeta potencijal od - 2,9 mV što pridonosi tezi da se radi o nestabilnom sustavu.

Mjerenjem zeta potencijala uzoraka bnSeMr i bnSeMp prije digestije, za pretpostaviti je da se radi o stabilnim sustavima jer je zeta potencijala u oba slučaja bio negativniji od - 35 mV. Stabilnost uzorka bnSeMr od 6,3 %, i veličine čestica od >320 nm i >5400 nm nakon digestije, pokazuju nestabilan sustav uz pretpostavku loše biorasploživosti. Uzorak bnSeMp sa stabilnošću < 20%, ali česticama od 186,5 nm nakon digestije pokazuje potencijalnu stabilnost i dobru biorasploživost sustava. S obzirom da je veličina čestica određena DLS metodom te podrazumijeva i doprinos vodenog omotača oko čestice, može se pretpostaviti da je stvarna veličina čestice nešto manja, dakle upravo oko optimalnih 100 nm.

Usporedbom sirovih pektina rajčice sa sirovim pektinima mandarine vidljivo je da su oba sustava nestabilna. Sirovi pektini rajčice pri tome su ipak nešto stabilniji jer nakon aglomeracije njihova veličina ne prelazi 400 nm, dok čestice obložene sirovim pektinima mandarine prelaze u mikropodručje. Usporedbom zeta potencijala prije digestije i koncentracije i stabilnosti nakon digestije može se utvrditi da su razlike među uzorcima zanemarive i da uzorci nanoselena sa

sirovim pektinima predstavljaju nestabilan sustav. Nasuprot uzorcima inkapsuliranim sirovim pektinima, uzorci obloženi s pročišćenim pektinima rajčice i mandarine pokazuju razlike. Gledajući raspodjelu veličina čestica nakon digestije može se zaključiti da su uzorci koji sadrže pročišćene pektine mandarine stabilniji jer zadržavaju unimodalnu raspodjelu i nakon digestije pri čemu im se smanjuje i veličina. Kod uzoraka nanoselena s pročišćenim pektinima rajčice dolazi do raspada nanoselena pri čemu nastaju 3 frakcije od kojih 2 sadrže čestice manje od 150 nm te frakcija od 4% čestica veličine 378,6 nm. Ovakav uzorak je nestabilan zbog raspada čestica, ali i dalje zadržava potencijalno dobru bioraspodjelivost. Uzorak nanoselena s pročišćenim pektinima mandarine predstavlja potencijalno stabilan sustav. Usporedbom uzoraka sa sirovim i pročišćenim pektinima može se zaključiti da su uzorci koji sadrže sirove pektine u potpunosti nestabilni, a oni s pročišćenim pektinima pokazuju potencijalnu stabilnost. Razlog ovakvih rezultata mogu biti onečišćenja prisutna u frakcijama sirovih pektina, a koji su isprani etanolom u pročišćenim frakcijama. Ovo je dokaz da je potrebno utvrditi čistoću pektina te ih detaljno okarakterizirati prije nego što se počnu komercijalno koristiti u ovakve svrhe.

Potrebno je provesti još mnogo istraživanja kako bi se utvrdila stvarna gastrointestinalna stabilnost, kako samih nanočestica među kojima je i nanoselen, tako i oblagajućih sredstava kao što su pektini. Zasada postoje tek malobrojna istraživanja koja ne pokazuju prevelike rezultate. Jedno od njih je i ono Pornwilara i sur. (2014) koji su proveli istraživanje stabilnosti nanoselena u gastrointestinalnim uvjetima. Nanoselen je pritom stabiliziran polisaharidnim frakcijama pektina i smjesom alginata i pektina te proteinskim frakcijama ovalbumina i  $\beta$ -laktoglobulina. Nakon provedene digestije pikovi promatrani UV/Vis i ICP-MS detektorima pokazali su slične rezultate. Pikovi u uzorcima s pektinima, nakon digestije bez enzima, pokazali su maksimum na 64 nm, a oni sa smjesom alginata i pektina na 37 nm. Pri pH 7,0 manja je viskoznost uzoraka nanoselena sa smjesom alginata i pektina pa dolazi do povremenih sudaranja molekula. Pri pH 2,0 toga nema jer alginati tvore viskoznan gel onemogućavajući gibanje čestica. Ovo je mogući razlog manjih čestica nanoselena kod uzorka sa smjesom alginata i pektina od onog sa selenom. Pikovi u uzorcima nanoselena s proteinskim frakcijama pokazuju maksimum na 30 nm za ovalbumin i 23 nm za  $\beta$ -laktoglobulina. Nakon toga provedenom TEM metodom također je utvrđeno da su nanočestice s pektinima bile veće od onih s ovalbuminom. Iz čega se može zaključiti da su proteinske frakcije stabilnije od polisaharidnih u ulozi oblagajućeg sredstva.

Također, zanimljiv je rad Huang-a i sur. (2019) koji su provodili ispitivanje gastrointestinalne stabilnosti nanočestica resveratrola obloženih smjesom zeina i pektina. Čestice su se pokazivale

otpornim na agregaciju pri pH 2-7 te im promjer nije prelazio 230 nm. Pri porastu pH 6,0-6,5 dolazi do rasta čestica nakon čega slijedi pad u veličini pri pH 7,0. Tada čestice pokazuju najmanji promjer od cca 120 nm. Smatra se da pritom dolazi do promjene u elektrostatskim interakcijama među pektinskim i zeinskim molekulama koje uzrokuju ovakvo ponašanje. Zeta potencijal čestica bez oblagajućih molekula pektina kretao se od jako negativnog pri pH 7,0 do jako pozitivnog pri pH 2,0. Pri pH 6,0 zeta potencijal bio je 0 što se poklapa s izoelektričnom točkom zeina. Čestice kapsulirane sa zein/pektinskim omotačem pokazivale su negativan potencijal u cijelom području pH što dovodi do zaključka da je zeta potencijal čestice određen potencijalom pektinskog omotača. Nanočestice obložene kombinacijom zeina i pektina otpornije su na agregaciju nakon oblaganja čestice s dva sredstva suprotnog naboja zbog povećanog steričkog i elektrostatskog odbijanja među česticama.

Uz navedene radove može se zaključiti da su nanočestice same po sebi izrazito nestabilne te da se može utjecati na njihovu gastrointestinalnu stabilnost korištenjem različitih oblagajućih molekula. Pritom su oblagajuća sredstva u kombinacijama bolja od onih koji se koriste samostalno. Tu i sami pektini pokazuju veliku ulogu jer održavaju negativan potencijal na površini čestice te tako smanjuju njihovu aglomeraciju, ali sami po sebi nisu dovoljno stabilni kako bi zadržali stabilnost nanočesticama.

## 5 ZAKLJUČCI

- Primjenom sirovih i pročišćenih frakcija pektina izoliranih iz komine rajčice i kore mandarine moguće je sintetizirati nanočestice selena unimodalne raspodjele veličine čestica (104.2-147.6 nm) i zadovoljavajućeg zeta potencijala (oko -35 mV)
- Korištenjem pektina rajčice dobiju se manje nanočestice (oko 100 nm), a korištenjem pektina mandarine nanočestice srednjeg promjera od oko 250 nm
- Ekstrakt komine masline može se koristiti u sintezi nanočestica selena samo u kombinaciji sa sintetskim inkapsulacijskim sredstvima kao što je polisorbit pri čemu nastaju čestice prosječnog promjera 44.4 nm i zeta potencijala oko -20 mV
- Gastrointestinalnu stabilnost nanočestica moguće je istražiti *in vitro* simulacijom procesa probave pri čemu se promjene prate kombiniranjem spektrofotometrijskog određivanja koncentracije nanoselena u sustavu i metode laserskog raspršenja svjetlosti. Spektrofotometrijsko određivanje nanoselena ograničeno je činjenicom da promjena apsorbancije sustava reflektira ne samo oksidaciju elementarnog selena već i promjenu veličine (broja) nanočestica u sustavu te su moguća različita tumačenja opaženih promjena
- Proces probave značajno utječe na raspodjelu veličina čestica nanoselena svih istraživanih uzoraka pri čemu nanočestice aglomeriraju ili se raspadaju na manje čestice
- Uzorci inkapsulirani pročišćenim pektinima mandarine se tijekom procesa probave smanjuju (na 186.5 nm), ali ostaju u obliku nanočestica, a manji srednji promjer naviješta bolju apsorpciju nakon procesa probave. Nasuprot tome, nanoselen inkapsuliran sirovom pektinskom frakcijom nestabilan je tijekom procesa probave (nastajanje aglomerata)
- Kod uzoraka nanoselena s pročišćenim pektinima rajčice dolazi do raspada nanoselena pri čemu nastaju 3 frakcije od kojih 2 sadrže čestice manje od 150 nm te frakcija od 4%



čestica veličine 378,6 nm. Korištenjem sirove pektinske frakcije nastaju nestabilnije čestice koje aglomeriraju tijekom procesa probave

- Nanočestice pripremljene korištenjem ekstrakta komine masline zadovoljavajućih su karakteristika samo uz istovremenu primjenu polisorbata kao inkapsulacijskog sredstva. Sustav je stabilan i tijekom probave (dolazi do porasta srednjeg promjera, ali čestice su i dalje manje od 100 nm)

## 6 LITERATURA

Albahari P, Jug M, Radić K, Jurmanović S, Brnčić M, Rimac Brnčić S, Vitali Čepo D. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *LWT*, 2018, 92, 22-31.

Bohn T, Carriere F, Day L, Deglaire A, Egger L, Freitas D, Golding M, Le Feunteun S, Macierzanka A, Menard O, Miralles B, Moscovici A, Portamn R, Recio I, Remond D, Sante-Lhoutelier V, Wooster T, Lesmes U, Mackie A, Dupont D. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models?. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(13), 2239-2261.

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, Kirkhuss B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie AR, Martins C, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Minekus M, Portmann R, Santos CN, Souchon I, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Recio I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*, 2019, 14(4), 991-1014.

Cardoso SM, Guyot S, Marnet N, Lopes-da-Silva JA, Renard CM, Coimbra MA. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J Sci Food Agric*, 2005, 85(1), 21-32.

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

Cavalu S, Prokisch J, Laslo V, Vicas S. Preparation, structural characterisation and release study of novel hybrid microspheres entrapping nanoselenium, produced by green synthesis. *IET nanobiotechnol*, 2017, 11(4), 426-432.

Chomto P, Nunthanid J. Physicochemical and powder characteristics of various citrus pectins and their application for oral pharmaceutical tablets. *Carbohydr Polym*, 2017, 174, 25-31.

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), 1466.

De Castro ML, Garcia-Ayuso LE. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta*, 1998, 369(1-2), 1-10.

Dranca F, Oroian M. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Res Int*, 2018, 113, 327-350.

Gama B, Silva CDF, Da Silva LO, Abud ADS. Extraction and characterization of pectin from citric waste. *Chem Eng Trans*, 2015, 44, 259-264.

Grassino AN, Ostojić J, Miletić V, Djaković S, Bosiljkov T, Zorić Z,... Brnčić M. Application of high hydrostatic pressure and ultrasound-assisted extractions as a novel approach for pectin and polyphenols recovery from tomato peel waste. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2020, 64, 202424

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

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

Jeguirim M, Goddard ML, Tamosiunas A, Berrich-Betouche E, Azzaz AA, Praspaliauskas M, Jellali S. Olive mill wastewater: From a pollutant to green fuels, agricultural water source and bio-fertilizer. Biofuel production. *Renew Energy*, 2020, 149, 716-724.

Kieliszek M. Selenium-fascinating microelement, properties and sources in food. *Molecules*, 2019, 24(7), 1298.

Korde P, Ghotekar S, Pagar T, Pansambal S, Oza R, Mane D. Plant extract assisted eco-benevolent synthesis of selenium nanoparticles-a review on plant parts involved, characterization and their recent applications. *J Chem Rev*, 2020, 157-168.

Kumar A, Prasad KS. Role of nano-selenium in health and environment. *J Biotechnol*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.004>

Li C, Yu W, Wu P, Chen XD. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 96, 114-126.

Lockitch G. Selenium: clinical significance and analytical concepts. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1989, 27(6), 483-541.

Lu Z, Wang J, Gao R, Je F, Zhao G. Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 86, 172-187.

Maxwell EG, Belshaw NJ, Waldron KW, Morris VJ. Pectin—an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends Food Sci Technol*, 2012, 24(2), 64-73.

Modelling of Dilution of Therma Discharges in Enclosed Coastal Waters, 2013, [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net), pristupljeno 23.4.2021.

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

Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(3), 266-277.

Müller-Maatsch J, Bencivenni, M, Caligiani A, Tedeschi T, Bruggeman G, Bosch M, Petrusan J, Droogenbroeck BV, Elst K, Sforza S. Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chem*, 2016, 201, 37-45.

Murugesan G, Nagaraj K, Sunmathi D, Subramani K. Methods involved in the synthesis of selenium nanoparticles and their different applications—a review. *Eur J Biomed*, 2019., 6(4), 189-194.

Nano- značenje i definicija, [www.jezikoslovac.com](http://www.jezikoslovac.com), pristupljeno 22. 04. 2021.

Orešković J, Ispitivanje utjecaja pomoćnih tvari na fizičku stabilnost suspenzije posakonazola, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2015, citirano: 25.04.2021., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:026216>

Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, del Pilar Rodriguez-Torres M, Acosta-Torres LS, Diaz-Torress LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S, Shin HS. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J nanobiotechnology*, 2018, 16(1), 1-33.

Petek A, Analitičke metode izolacije funkcionalnih sastojaka iz nusproizvoda kave, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2020, citirano: 13.02.2021., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:169075>

Pornwilard MM, Somchue W, Shiowatana J, Siripinyanond A. Flow field-flow fractionation for particle size characterization of selenium nanoparticles incubated in gastrointestinal conditions. *Food Res Int*, 2014, 57, 203-209.

Rafiq S, Kaul R, Sofi SA, Bashir N, Nazir F, Ahmad Nayik G. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *J Saudi Soc Agric Sci*, 2018, 17, 351-358.

Rayman MP. The importance of selenium to human health. *lancet*, 2000, 356(9225), 233-241.

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

Spectrophotometry, 2020., [www.chem.libretexts.org](http://www.chem.libretexts.org), pristupljeno 25.4.2021.

Sriamornsak P. Application of pectin in oral drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 8(8), 2011, 1009-1023.

Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *SUIJ*, 2003, 3(1-2), 206-228.

Stadtman TC. Selenium biochemistry. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59(1), 111-127.

Šafarik T, Sinteza i kemijska modifikacija silikatnih i biorazgradivih nanočestica, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, 2018, citirano: 25.04.2021., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:753575>

Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr*, 2004, 58(3), 391-402.

Twinomuhwezi H, Godswill AC, Kahunde D. Extraction and Characterization of Pectin from Orange (*Citrus sinensis*), Lemon (*Citrus limon*) and Tangerine (*Citrus tangerina*). *Am J Phys*, 2020, 1(1), 17-30.

## 7 SAŽETAK

Glavni ciljevi ovog rada bili su istražiti mogućnosti zelene sinteze nanoselena primjenom sirovih i pročišćenih pektina ekstrahiranih iz kore mandarine i komine rajčice i ekstrakta komine masline bogatog polifenolima. Istražen je utjecaj različitih uvjeta sinteze na raspodjelu veličine dobivenih nanočestica i zeta potencijal te gastrointestinalnu stabilnost. Primjenom sirovih i pročišćenih frakcija pektina izoliranih iz komine rajčice i kore mandarine moguće je sintetizirati nanočestice selena unimodalne raspodjele veličine čestica (104.2-147.6 nm) i zadovoljavajućeg zeta potencijala (oko -35 mV) dok je ekstrakt komine masline moguće primijeniti samo u kombinaciji sa sintetskim inkapsulacijskim sredstvima (polisorbat). Proces probave značajno utječe na raspodjelu veličina čestica nanoselena svih istraživanih uzoraka pri čemu nanočestice aglomeriraju ili se raspadaju na manje čestice. Najstabilniji sustavi potencijalno dobre bioraspoloživosti bili su oni inkapsulirani pročišćenim pektinskim frakcijama. Rezultati ovog istraživanja značajno doprinose postojećim saznanjima o mogućnostima primjene prirodnih ekstrakata u sintezi metalnih nanočestica te gastrointestinalnoj stabilnosti nanoselena te mogućnostima i opravdanosti njegove primjene kao nutraceutika.

## **SUMMARY**

The main objectives of this study were to investigate the possibilities of green synthesis of nanoselenium using raw and purified pectins extracted from mandarin peel, tomato pomace and olive pomace extract rich in polyphenols. The influence of different synthesis conditions on the size distribution, zeta potential and gastrointestinal stability of the obtained nanoparticles was investigated. It is possible to synthesize selenium nanoparticles with unimodal particle size distribution (104,2-147,6 nm) and satisfactory zeta potential (around -35 mV) using raw and purified pectin fractions isolated from tomato pomace and mandarin peel, while olive pomace extract can be used only in combination with encapsulating agents (polysorbate). The process of digestion significantly affects particle size distribution of nanoselenium of all investigated samples, whereby the nanoparticles agglomerate or disintegrate into smaller particles. The most stable systems with potentially good bioavailability were those encapsulated with purified pectin fraction. The results of this research significantly contribute to the existing knowledge about possibilities of using natural extracts in synthesis of metal nanoparticles and the gastrointestinal stability of nanoselenium, as well as the possibilities and justification of its use as a nutraceutical.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Gastroinetsinalna stabilnost nanočestica selena

Jelena Štimac

#### SAŽETAK

Glavni ciljevi ovog rada bili su istražiti mogućnosti zelene sinteze nanoselena primjenom sirovih i pročišćenih pektina ekstrahiranih iz kore mandarine i komine rajčice i ekstrakta komine masline bogatog polifenolima. Istražen je utjecaj različitih uvjeta sinteze na raspodjelu veličine dobivenih nanočestica i zeta potencijal te gastrointestinalnu stabilnost. Primjenom sirovih i pročišćenih frakcija pektina izoliranih iz komine rajčice i kore mandarine moguće je sintetizirati nanočestice selena unimodalne raspodjele veličine čestica (104.2-147.6 nm) i zadovoljavajućeg zeta potencijala (oko -35 mV) dok je ekstrakt komine masline moguće primijeniti samo u kombinaciji sa sintetskim inkapsulacijskim sredstvima (polisorbata). Proces probave značajno utječe na raspodjelu veličina čestica nanoselena svih istraživanih uzoraka pri čemu nanočestice aglomeriraju ili se raspadaju na manje čestice. Najstabilniji sustavi potencijalno dobre bioraspoloživosti bili su oni inkapsulirani pročišćenim pektinskim frakcijama. Rezultati ovog istraživanja značajno doprinose postojećim saznanjima o mogućnostima primjene prirodnih ekstrakata u sintezi metalnih nanočestica te gastrointestinalnoj stabilnosti nanoselena te mogućnostima i opravdanosti njegove primjene kao nutraceutika.

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

Rad sadrži: 51 stranice, 22 grafičkih prikaza, 3 tablice i 42 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoselen, kora mandarine, komina rajčice, ekstrakt komine masline, pektini, polifenoli, stabilnost, digestija

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Lovorka Vujić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Lipanj, 2021.



## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Gastrointestinal stability of selenium nanoparticles

**Jelena Štimac**

#### SUMMARY

The main objectives of this study were to investigate the possibilities of green synthesis of nanoselenium using raw and purified pectins extracted from mandarin peel, tomato pomace and olive pomace extract rich in polyphenols. The influence of different synthesis conditions on the size distribution, zeta potential and gastrointestinal stability of the obtained nanoparticles was investigated. It is possible to synthesize selenium nanoparticles with unimodal particle size distribution (104,2-147,6 nm) and satisfactory zeta potential (around -35 mV) using raw and purified pectin fractions isolated from tomato pomace and mandarin peel, while olive pomace extract can be used only in combination with encapsulating agents (polysorbate). The process of digestion significantly affects particle size distribution of nanoselenium of all investigated samples, whereby the nanoparticles agglomerate or disintegrate into smaller particles. The most stable systems with potentially good bioavailability were those encapsulated with purified pectin fraction. The results of this research significantly contribute to the existing knowledge about possibilities of using natural extracts in synthesis of metal nanoparticles and the gastrointestinal stability of nanoselenium, as well as the possibilities and justification of its use as a nutraceutical.

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

Thesis includes: 51 pages, 22 figures, 3 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoselenium, mandarin peel, tomato pomace, olive pomace extract, pectins, polyphenols, stability digestion

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

The thesis was accepted: June, 2021.

