

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina odabranih vrsta roda Veronica L. (Plantaginaceae)

Anić, Dora

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:762635>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

DORA ANIĆ

Zagreb, 2021.

Dora Anić

**Određivanje antioksidacijskog potencijala i
karakterizacija nanočestica selena s omotačem
pektina dobivenih iz komine rajčice**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na potpori, savjetima i strpljenju. Također veliko hvala asistenticama Nikolini Golub i Kristini Radić na pomoći pri izradi ovoga rada. Posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su bili uz mene kroz sve godine studiranja. Naposljetku hvala Tomislavu na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Selen.....	1
1.1.1. Nanočestice selena	3
1.2. Pektin	4
1.2.1. Pektin kao inkapsulacijsko sredstvo	6
1.3. Komina rajčice	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Priprema komine rajčice	9
3.1.2. Ekstrakcija pektina komine rajčice	9
3.1.3. Priprema nanoselena	9
3.1.4. Kemikalije.....	11
3.1.5. Korišteni instrumenti i oprema	11
3.2. Metode	12
3.2.1. Mjerenje raspodjele veličine čestica	12
3.2.2. Određivanje zeta potencijala.....	12
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja nanoselena.....	14
3.2.4. Ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) metodom.....	17
3.2.5. Ispitivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom	17
3.2.6. Statistička analiza.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Veličina nanočestica	19
4.2. Zeta potencijal nanočestica	29
4.3. TEAC antiradikalna učinkovitost	34
4.4. Ukupan redukcijski potencijal	37
5. ZAKLJUČCI.....	42

6. LITERATURA	44
7. SAŽETAK	49

1. UVOD

1.1. Selen

Selen kao mikronutrijent iznimno je važan za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Najznačajniji izvori selena u prehrani su meso, riba, tjestenina, riža i orašasti plodovi, od kojih po količini selena prednjači brazilski oraščić koji je ujedno i najbolji izvor selena uopće. Preporučeni dnevni unos selena za odrasle osobe je 55 µg dok maksimalna dnevna doza iznosi 300 µg. Međutim u Europi je prosječan dnevni unos niži od preporučene dnevne doze (40 µg), dok je u SAD-u viši (93 µg). Razlika u prosječnom dnevnom unosu selena između država, a pogotovo kontinenata, proizlazi iz izrazito varijabilnih koncentracija selena u tlu što je izravno povezano sa sadržajem selena u namirnicama koje ljudi konzumiraju te u pitkoj vodi. Selen se u namirnicama može nalaziti u anorganskom i organskom obliku, a iako su oba oblika dobri nutritivni izvori selena, organski oblik ima bolju bioraspoloživost (Rayman, 2000). Anorganski oblici selena su selenit (SeO_3^{2-}), selenid (Se^{2-}), selenat (SeO_4^{2-}) i elementarni selen dok su najčešći organski oblici selenocistein i selenometionin. Što se tiče apsorpcije selena, ona se gotovo potpuno događa u dvanaesniku i slijepom crijevu. Na nju može negativno utjecati visoka koncentracija drugih elemenata u tijelu poput sumpora, kalcija i olova. Sami mehanizmi apsorpcije različiti su za različite oblike selena: selenit se apsorbira jednostavnom difuzijom, selenat kotransportom s natrijem, dok organski oblici slijede mehanizam apsorpcije kao aminokiseline. Anorganski oblici selena te selenocistein se nakon apsorpcije reduciraju do selenida pomoću glutaciona i glutation reduktaze. Selenid se nadalje pomoću istog enzima prevodi u selenofosfat i selenocistein-tRNA, oblik selena koji organizam može integrirati u polipeptidni lanac čime nastaju selenoproteini (Mehdi i sur., 2013). U aktivnom mjestu gotovo svih selenoproteina nalazi se upravo selenocistein koji se naziva i dvadeset i prvom aminokiselinom. Glutacion predoksidaze, jodotironin dejodinaze i tioredoksin reduktaze samo su neki od primjera selenoproteina presudnih za održavanje homeostaze. Selen u tim proteinima funkcionira kao redoks centar, tako na primjer u aktivnom mjestu glutacion peroksidaze uzrokuje redukciju vodikovog peroksida u netoksične spojeve: alkohole i vodu (Rayman, 2000). Nadalje, selenid koji nije iskorišten za sintezu selenoproteina se u krvnoj plazmi u najvećoj mjeri veže za albumin, ali također i za α - i β -globulin, LDL (lipoprotein niske gustoće) te VLDL (lipoprotein vrlo niske gustoće). Vezan za proteine, selen se plazmom prenosi do jetre, koja uz bubrege, služi za skladištenje rezerve selena. Bubrezi sudjeluju i u eliminaciji selena, koja se najvećim dijelom odvija putem urina (Mehdi i sur., 2013).

Deficit selena uzrokuje općenito lošije stanje imunološkog sustava te je povezan s brojnim patološkim stanjima. Za početak, istraživanja pokazuju da osobe čija je koncentracija selena u serumu niska imaju veći rizik od oboljenja od ishemijskih bolesti srca. Nadalje, nedostatak selena u organizmu se povezuje s različitim problemima u reproduktivnom sustavu. Kod žena nizak status selena u organizmu povećava vjerojatnost preeklampsije te povećava rizik od pobačaja u ranim stadijima trudnoće. Kod muškaraca je za pokretljivost spermija iznimno bitan selenoprotein glutation peroksidaza 4, a nedostatak selena uzrokuje njegovu smanjenu sintezu (Rayman, 2012). Postoje također i dvije endemske bolesti povezane s nedostatkom selena u ljudskom organizmu koje se najčešće pojavljuju u Kini zbog toga što je kinesko tlo iznimno siromašno tim mineralom. Prva se zove Keshan bolest; to je kardiomiopatija koja najčešće pogađa djecu i žene u reproduktivnoj dobi. Druga je Kashin-Beck bolest: kronični degenerativni osteoartritis koji zahvaća periferne zglobove i kralježnicu uzrokujući apoptozu hijaline hrskavice (Fordyce, 2013). Naposljetku selen se u velikoj mjeri povezuje s normalnim funkcioniranjem štitnjače, koja je ujedno i organ s najvećom količinom selena po gramu tkiva. Nedostatak selena za sobom povlači smanjenu sintezu tiroidnih hormona, upravo zbog činjenice da je o selenu ovisan enzim, jodotironin dejodinaza, zadužen za pretvorbu tiroksina (T₄) u trijodtironin (T₃). Smanjena razina trijodtironina nadalje dovodi do aktivacije hipotalamus-hipofiza osi i povećane sinteze THS koji potpomaže pretvorbu tiroksina u trijodtironin, ali uz vodikov peroksid kao nusprodukt. Zbog nedovoljne količine selena u organizmu, koja uzrokuje smanjenu aktivnost glutation peroksidaze, vodikov peroksid se ne razgrađuje u dovoljnoj mjeri te uzrokuje oštećenje štitne žlijezde (Ventura i sur., 2017).

Zbog svega navedenog, u nekim slučajevima potrebno je uz prehranu koristiti i selen u obliku dodatka prehrani. Takva suplementacija se preporuča ne samo u slučajevima nedostatnog unosa selena prehranom, nego i kod nekih patoloških stanja kao što su Chronova bolest i HIV, također kod osoba koje imaju kardiovaskularne probleme i probleme sa štitnjačom poput Hashimoto sindroma te kod osoba na dijalizi zbog oštećenja bubrega (Skalickova i sur., 2017). Međutim, bitno je naglasiti da je selen u previsokim dozama toksičan. Kronična suplementacija visokim dozama selena uzrokuje metalan okus u ustima, miris daha po češnjaku te selenozu. Simptomi selenoze su gubitak kose, lezije na koži, mučnina, povraćanje, a napretkom stanja dolazi do smanjene kognitivne funkcije mozga, slabosti i paralize (Nuttall, 2006).

1.1.1. Nanočestice selena

Veliki problem oralne primjene nekih lijekova jest njihova niska topljivost, a kod primjene visokih doza lijekova također i toksičnost. Upravo zbog niske topljivosti neki lijekovi primijenjeni *per os*, bez obzira na svoj odličan terapijski potencijal, imaju nezadovoljavajuću bioraspoloživost. Formuliranjem takvih lijekova u nanočestice može se izravno povećati njihova oralna bioraspoloživost što omogućuje primjenu niže doze lijeka (Shubhika, 2013). Također, nanočestice imaju bolju stabilnost, u odnosu na klasične ljekovite oblike, i znatno su otpornije na nisku pH-vrijednost želuca te enzimsku razgradnju. Iz tog razloga mogu se koristiti za ciljanu dostavu lijekova čime se, osim poboljšanja aktivnosti i dostave veće doze lijeka na mjesto djelovanja, smanjuje toksičnost za ostale organe. Iz istog razloga se u obliku nanočestica mogu primjenjivati proteini: klasično primijenjeni bi se razgradili djelovanjem želučanih enzima, međutim u nano obliku su zaštićeni i mogu doći na mjesto djelovanja (Hosendlova i sur., 2018). Međutim postoje i mane primjene nanočestica. Smanjeni promjer čestica za sobom povlači povećanu kontaktnu površinu lijeka koja dovodi do njegove veće kemijske aktivnosti. Veća kemijska aktivnost lijeka uzrokuje nesigurnost u predviđanju djelovanja lijeka pod različitim fiziološkim uvjetima. Također zbog veće kemijske aktivnosti proizvode se reaktivni kisikovi spojevi koji mogu uzrokovati upale, oksidativni stres te oštećenje DNA. Nadalje, promjene u obliku i veličini mogu značajno utjecati na njihova fizikalna i kemijska svojstva pa tako određena nanočestica promjera 100 nm može biti netoksična, dok ta ista čestica promjera 1 nm može biti iznimno toksična i obrnuto (Shubhika, 2013). Naposljetku, manje čestice imaju znatno veću aktivnost pa tako čestice promjera 0,1 μm imaju 2,5 – 6 puta veću aktivnost od onih promjera 1 – 10 μm (Hosendlova i sur., 2018).

Značaj i terapijske mogućnosti primjene selena su brojne, međutim terapijski indeks oralno primijenjenog organskog i anorganskog selena je nizak zbog čega se sve više sintetizira i primjenjuje u obliku nanočestica.

Sintezu nanočestica moguće je provesti biološkim, fizikalnim i kemijskim putem. Biološku sintezu nanoselena provode određene bakterije (npr. *Bacillus selenireducens* i *Sulfurospirillum barnesii*) (Prasad i sur., 2013) ili se provode pomoću ekstrakata biljaka (npr. *Capsicum annuum* i *Terminalia arjuna*) (Prasad i Selvaraj, 2014). Zabilježena su mnoga pozitivna svojstva čestica nanoselena sintetiziranih na ovaj način; smanjenje toksičnosti na modelu humanih limfocita uzrokovane UVB zračenjem ili trovalentnim arsenom te također pojačavanje protutumorskog djelovanja (Prasad i sur., 2013; Prasad i Selvaraj, 2014; Sonkusre i sur., 2014). Nadalje, neke od fizikalnih metoda sinteze nanočestica su laserska ablacija, termička evaporacija i pulsirajuća

laserska desorpcija, a od kemijskih električna depozicija i sol-gel proces. Loša strana sintetiziranja nanočestica klasičnim kemijskim metodama jest da se koriste kemikalije u visokim koncentracijama što može biti opasno i za okoliš i za ljudsko zdravlje. Upravo zbog toga se u današnje vrijeme sve više pažnje posvećuje takozvanoj zelenoj sintezi koji obuhvaća sintezu nanočestica pomoću ekološki prihvatljivih, netoksičnih i sigurnih reagensa (Parveen i sur., 2016). U zelenu sintezu se ubraja i ranije spomenuta biološka sinteza nanočestica, ali također i sinteza nanočestica kemijskim putem uz upotrebu netoksičnih otapala i spojeva prirodnog podrijetla poput reducirajućih šećera, prirodnih spojeva izoliranih iz biljaka, kitozana i dr. Kada se takvi spojevi koriste kao omotači u sintezi nanočestica, dobivene čestice imaju jače protutumorsko i imunomodulatorno djelovanje te također poboljšavaju regulaciju štitne žlijezde (Menon i sur., 2019).

Još jedna dobra strana primjene selena u obliku nanočestica, nevezano uz tip sinteze, jest da takav sferičan oblik čestica pokazuje jednaki antioksidacijski potencijal kao i klasičan preoralni oblik, ali sa smanjenom mogućnosti toksičnog učinka selena. Naime, zbog povećane stabilnosti nanočestica, selen u njima može biti u oksidacijskom stanju 0 koje ima nižu toksičnost, a ujedno i višu bioraspoloživost, od selena u ostalim oksidacijskim stanjima ($\text{Se}^{\text{VI}+}$, $\text{Se}^{\text{IV}+}$ i $\text{Se}^{\text{II}+}$). Također, mnogim studijama je potvrđena antimikrobna i antifungalna aktivnost selena upravo u ovom obliku (Hosendlova i sur., 2018). Antimikrobna aktivnost nanočestica selena većinom potječe od reaktivnih kisikovih spojeva čije nastajanje nanoselen potiče. Ti spojevi dovode do poremećaja fosfolipodnog dvosloja stanične stijenke bakterija gdje nanočestice selena ulaze u interakcije s unutarstaničnim proteinima te ih inaktiviraju. Ovakvo bakteriostatsko djelovanje nanočestica selena pokazuje visoku efikasnost protiv rasta *Klebsiella sp.* i *Staphylococcus aureus* (Menon i sur., 2020; Nguyen i sur., 2017). Navedeno antimikrobno djelovanje nije specifično isključivo za nanočestice selena, pokazuju ga i druge metalne nanočestice, pogotovo nanočestice srebra, koje pokazuju visoku aktivnost protiv rasta *E. coli* i *S. aureus* (Das i sur., 2020). Uzevši u obzir sve veću rezistenciju bakterija na postojeće antibiotske lijekove, ova primjena nanočestica bi mogla biti iznimno bitna za budućnost medicine.

1.2. Pektin

Pektin ili pektinske tvari grupno je ime za strukturne polisaharidne spojeve koji se nalaze u staničnom zidu biljaka i čija je primarna uloga rast i diferencijacija stanica te zbog toga imaju veliku ulogu u rigidnosti i integritetu tkiva biljaka. Također djeluju u obrambenim mehanizmima biljaka protiv patogena i ozljeda (Voragen i sur., 2009). Strukturno gledajući,

pektin je kompleks velike molekularne mase koji se sastoji parcijalnih metilnih estera poligalakturonske kiseline i njihovih natrijevih, kalijevih i amonijevih soli. Specifičnije, pektin spada u prehrambena vlakna, a iako neki tipovi mogu biti netopljivi, zbog velikog broja hidroksilnih skupina koje potječu od galakturonske kiseline pektin se karakterizira kao topljivo vlakno. Kao dodatak hrani za ljudsku upotrebu, FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) je karakterizirala pektin kao GRAS (*Generally Recognized as Safe*), što znači da nema ograničenja za korištenje u tom aspektu. Pektin za komercijalnu upotrebu najčešće se izolira iz kometine jabuke ili kore citrusa, a najčešće se koristi kao gelirajuće sredstvo u izradi pekmeza i džemova, budući da pektin ostaje stabilan u kiselim uvjetima (Nussinovitch, 1997).

Pektini pokazuju imunomodulatorno djelovanje; dijelovi njihove strukture djeluju imunostimulatorno, a dijelovi imunosupresivno što otvara brojne mogućnosti u njihovoj primjeni kao imunomodulatora. Ogranci galakturonske kiseline djeluju inhibitorno na leukocitnu aktivnost, a bočni ugljikohidratni lanci blokiraju tu aktivnost. Vezano uz leukocitnu aktivnost, dokazano je da ju inhibiraju pektini metilirani u niskom postotku, dok ju oni metilirani u visokom postotku ne inhibiraju. Također, imunomodulatorno djelovanje ovisi o molekularnoj masi samog pektina; oni kojima je molekularna masa veća od 300 kDa imaju mogućnost smanjivanja reaktivnost imunološkog sustava. S druge strane, mnogi pektini u kojima je udio galakturonske kiseline manji od 75% mogu stimulirati fagocitozu budući da aktiviraju fagocite (Popov i Ovodov, 2013).

Svojstvo pektina da stvara viskozne gelove povoljno utječe na vezanje kolesterola i žučnih kiselina, smanjujući njihovu apsorpciju i povećavajući izlučivanje. Pektini koji sadrže veliki postotak metilnih estera povoljno utječu na smanjenje kolesterola u krvnoj plazmi, zbog toga što veća količina nepolarnih skupina povećava mogućnost vezanja žučnih kiselina koje su također nepolarne. To uzrokuje smanjenu interakciju između žučnih kiselina i kapljica masti što u konačnici inhibira apsorpciju masti (Espinal-Ruiz i sur., 2014).

Nadalje, pektini koji su u niskom stupnju metilirani ili oni koji imaju visok udio oligogalakturonskih segmenata imaju sposobnost vezanja na gastrointestinalnu mukozu i time poboljšavaju zaštitna svojstva mukozne membrane. Zbog toga potencijalno mogu pomoći kod liječenja gastrointestinalnih oštećenja ili čak infektivnih bolesti crijeva (Liu i sur., 2005).

Iako sam pektin nema antikoagulatorno djelovanje, pokazano je da njegova sulfatacija uzrokuje produživanje vremena koagulacije ljudske plazme usporedivo s nefrakcioniranim heparinom, naravno bez neželjenih posljedica heparina poput trombocitopenije i hemoragije. Ovo djelovanje pektina povećava se brojem sulfatnih skupina u samom pektinu (Vityazev i sur., 2010). Bitno je naglasiti da antikoagulatorno djelovanje, kao i sva ostala prethodno nabrojana

u ovom poglavlju, ne pokazuju svi pektini, nego je vezano uz biljku iz koje su pektini izolirani. Tako na primjer pektin izoliran iz biljke *Citrus sinensis* ima značajnu antikoagulacijsku aktivnost, dok pektin izoliran iz *Decalepis hamiltonii* pokazuje gastroprotektivnu aktivnost (Zaitseva i sur., 2020).

1.2.1. Pektin kao inkapsulacijsko sredstvo

Pektin se može koristiti za ciljanu dostavu lijekova, najčešće u kolon, budući da se tamo nalaze pektinolitički enzimi koje proizvodi mikroflora debelog crijeva. Korištenje prirodnih pektina kao nosača lijekova, za razliku od sintetskih nosača, ne uzrokuje alergijske reakcije te pokazuje smanjenu toksičnost zbog činjenice da pektin nije osjetljiv na enzime koji se izlučuju u želucu i tankom crijevu. (Zaitseva i sur., 2020). Nanočestice sintetizirane s pektinom kao omotačem pokazuju visoku stabilnost budući da zbog svojih električnih svojstava pektin stabilizira površinsku raspodjelu naboja nanočestica te povoljno utječe na vrijednosti zeta potencijala. Takve čestice također pokazuju dobru koloidnu stabilnost do 96 sati te mogu u sebi pohraniti visoku količinu lijeka. Upotreba pektina kao inkapsulacijskog sredstva kod primjene citostatika doksorubicina pokazala je da takve čestice imaju jače protutumorsko djelovanje od klasične otopine doksorubicina (Khotimchenko, 2020). Nadalje na ovaj način pektin se koristi za pakiranje inzulina u nanočestice što omogućava oralnu primjenu inzulina kod dijabetičara koja inače nije moguća budući da bi želučani enzimi razgradili inzulin prije nego što bi došao na mjesto djelovanja (Zaitseva i sur., 2020). Pektin se također uspješno koristi u zelenoj sintezi nanočestica zlata, srebra te cinkovog oksida. Postoje mnoga istraživanja koja pokazuju da su takvom sintezom dobivene monodisperzne čestice male veličine i visoke stabilnosti (Qiu i sur., 2018). Drugačija primjena pektina kao inkapsulacijskog sredstva je kada se koristi u kombinaciji s različitim polisaharidnim nosačima čestica poput kitozana. Na primjeru 5-fluorouracila je vidljivo da nanočestice koje imaju kombinirani omotač od pektina i kitozana pokazuju jaču protutumorsku aktivnost na kulturu HeLa stanica (epitelne stanice adenokarcinoma vrata maternice) od nanočestica koje imaju samo kitozan kao omotač. Takav kombinirani omotač može se koristiti i za sintezu nanočestica prirodnih tvari koje imaju loš farmakološki profil poput kurkumina (Khotimchenko, 2020).

1.3. Komina rajčice

Rajčica (*Solanum lycopersicum*, *Solanaceae*) je jedno od najkonzumiranijih vrsta povrća u svijetu, ali samo mali dio se konzumira u svježem obliku. U prehrambenoj industriji se

prerađuje te najčešće koristi u obliku soka, paste i koncentrata. Otpad koji nastaje pri njihovoj proizvodnji, najčešće kora i koštice, u manjoj količini pulpa, naziva se komina rajčice i na nju odlazi čak 3 – 5% mase originalnog sirovog materijala rajčice. Budući da je to velika količina otpada, skladištenje i iskorištenje predstavljaju problem, ne samo za prehrambenu industriju, nego i općenito, zbog značajnog ekološkog otiska. Zbog visokog sadržaja vode u komini rajčice, lako je kvarljiva te je potrebno ispravno skladištenje kako bi se njenom daljnjom preradom mogli izolirati korisni spojevi poput likopena, prehrambenih vlakana i proteina. Koštice i kora u komini imaju različit sastav: dok kora sadrži visok udio prehrambenih vlakana, likopena i fenolnih spojeva, koštice većinom sadrže proteine i ulja. Sukladno sadržaju, i koštice i kora rajčice mogu služiti za izolaciju funkcionalnih spojeva koji se dalje mogu koristiti u prehrambenoj, ali i u farmaceutskoj industriji. Likopen je, primjerice, karotenoid s iznimnim antioksidacijskim potencijalom, dok su prednosti pektina, kao predstavnika prehrambenih vlakana izoliranih iz kore rajčice, već prethodno navedene. Nadalje, primjena komine rajčice nije ograničena samo na izolaciju nutritivnih i funkcionalnih komponenti, već se može koristiti i u obliku praha kao dodataka prehrani te za hranjenje životinja (Lu i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom na značajnu proizvodnju i preradu rajčice u svijetu, troškovi adekvatnog zbrinjavanja otpada koji nastaje tijekom tih procesa su veliki. Kako bi se smanjio ekološki otisak procesa prerade uz istodobno povećanje njezine ekonomske isplativosti, raste broj istraživanja kojima se nastoje optimirati postojeći i razviti novi postupci iskorištenja komine rajčice kao sekundarne sirovine u smislu formulacije novih kategorija funkcionalnih proizvoda s dodatnom vrijednošću. U tom kontekstu komina rajčice je posljednjih godina prepoznata kao izvor visokokvalitetnih pektina te su brojna istraživanja usmjerena na razvoj učinkovitih i održivih postupaka ekstrakcije pektina iz komine rajčice.

Selen je čest sastojak multimineralnih preparata, a na tržištu postoji i kao samostalan dodatak prehrani. Iako se najčešće primjenjuje u obliku selenita, selenocisteina ili kvasaca bogatih selenom, novija istraživanja ukazuju na moguće koristi primjene selena u obliku nanočestica u odnosu na navedene klasične oblike. Osnovni cilj ovog rada je istražiti mogućnosti primjene različitih pektinskih frakcija izoliranih iz komine rajčice kao inkapsulacijskih sredstava u zelenoj sintezi nanoselena. Cilj optimizacije takvog zelenog procesa sinteze nanoselena jest razvoj stabilnog sustava odgovarajućih karakteristika koje će omogućiti adekvatnu bioraspoloživost i biološku aktivnost selena. Dodatno, ovakva inovativna primjena pektinskih frakcija iz komine rajčice može doprinijeti poboljšanju iskoristivosti otpada rajčice čime se direktno utječe na smanjenje ekološkog otiska, ali i troškova procesa prerade.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Priprema komine rajčice

Istraživanje je provedeno na uzorku komine rajčice (*Solanum lycopersicum*, *Solanaceae*). Komina je ranije bila smrznuta te je nakon odmrzavanja bila dodatno posušena na 60 °C kako bi se uklonio ostatak vode. Nakon toga je prosijana na veličinu čestica 0,8 mm zbog uklanjanja koštica i homogenizacije uzorka. Prosijana frakcija komine bez koštica odmašćena je na Soxlet uređaju uz korištenje petroletera kao otapala (Garcia-Vaquero i sur., 2020).

3.1.2. Ekstrakcija pektina komine rajčice

Ekstrakcija pektina iz odmašćene komine rajčice provedena je u trajanju 1,5 h korištenjem 1%-tne limunske kiseline kojoj je pH-vrijednost namještena na 1,5. Po završetku ekstrakcije uzorak je, još vruć, dva puta profiltriran kroz običan filter papir. Nakon filtracije u filtrat je dodan volumen 96%-tnog etanola koji odgovara dvostrukom volumenu filtrata kako bi se pektin istaložio te je Elermmayerova tikvica s uzorkom stavljena na magnetsku miješalicu u periodu od 2 h kako bi se postiglo maksimalno taloženje. Uzorak s istaloženim pektinom pohranjen je na 1 h u hladnjak na temperaturi od oko 4 °C. Nakon hlađenja uslijedila je vakuum filtracija uzorka te sušenje u sušioniku na 40 °C čime je dobiven uzorak sirovog pektina. Dio uzorka je nakon filtracije ispran četiri puta 63%-tnim etanolom kako bi se uklonili šećeri topljivi u tom otapalu te je također sušen na 40 °C čime je dobiven uzorak pročišćenog pektina (Casas-Orozco i sur., 2015).

3.1.3. Priprema nanoselena

Inkapsulacijsko sredstvo se dispergira u deioniziranoj vodi te se u tu otopinu najprije doda askorbinska kiselina, a potom i otopina Na₂SeO₃ tako da konačna koncentracija natrijevog selenita u otopini bude 0,58 mg/mL. Otopinu Na₂SeO₃ potrebno je dodavati kap po kap (brzina oko 1 kap / 2 s). Ovaj postupak se provodio korištenjem različitih koncentracija sirove i pročišćene pektinske frakcije te komercijalnog pektina, prema podacima prikazanim u Tablici

1. Također je pripremljen referentni uzorak gdje je kao inkapsulacijsko sredstvo korišten sintetski polivinilpirolidon (PVP).

Tablica 1. Koncentracije inkapsulacijskih sredstava (pektina) korištene za pripremu nanočestica selena

vrsta korištenog inkapsulacijskog sredstva	oznaka uzorka	koncentracija inkapsulacijskog sredstva (mg/mL)
sirovi pektin komine rajčice	PsR ₁	0,100
	PsR ₂	0,200
	PsR ₃	0,517
	PsR ₄	1,03
	PsR ₅	1,81
pročišćeni pektin komine rajčice	PpR ₁	0,100
	PpR ₂	0,200
	PpR ₃	0,517
	PpR ₄	1,03
	PpR ₅	1,81
komercijalni pektin	Pk ₁	0,100
	Pk ₂	0,200
	Pk ₃	0,517
	Pk ₄	1,03
	Pk ₅	1,86
PVP	PVP	1,00

PVP – polivinilpirolidon

Kako bi se pripremljene nanočestice odijelile od ostatka reakcijske smjese potrebno je sintetizirane nanočestice selena pročistiti postupkom dijalize. Kao pripremu za ovaj korak potrebno je odrezati dijalizijske membrane na duljinu 14 cm te ih staviti u deioniziranu vodu na 3 – 4 sata kako bi se namočile. Vodu je potrebno nekoliko puta promijeniti kako bi se isprali tragovi glicerola s membrana. Kada su membrane spremne najprije ih je potrebno zatvoriti s jedne strane, zatim pažljivo dodati željeni uzorak u membranu te ju naposljetku zatvoriti s druge strane. Iznimno je bitno paziti da ne ostanu mjehurići zraka unutar membrana jer membrana ne smije biti suha niti na jednom dijelu. Svaka napunjena membrana stavlja se u čašu s

deioniziranom vodom, a čaše s membranama se miješaju na magnetskoj miješalici kroz 24 h uz povremeno mijenjanje vode u kojoj se nalaze membrane (minimalno tri puta). Ovaj korak je bitan zbog pročišćenja nanočestica od ostataka reagenasa korištenih u procesu sinteze. Kako bi se onečišćenja isprala u okolni medij, a ispitivani uzorak ostao unutar membrana, potrebno je koristiti membrane s odgovarajućom veličinom pora.

3.1.4. Kemikalije

- Limunska kiselina 1-hidrat (Gram-mol, Hrvatska)
- 96%-tni etanol (Gram-mol, Hrvatska)
- Askorbinska kiselina (Gram-mol, Hrvatska)
- Natrijev selenit (Sigma-Aldrich, SAD)
- Ekstrakt komine rajčice
- Komercijalni pektin (Pectin E440, Esarom, Austrija)
- Voda – predestilirana, pročišćena i deionizirana, otpor manji od 18,2 M Ω pri 25 °C i ukupne masene koncentracije organskog ugljika < 5 μ g/L
- Folin-Ciocalteu fenol reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol – ABTS (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev karbonat bezvodni, p.a. (Lach-Ner, Češka)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Polivinilpirolidon (Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.5. Korišteni instrumenti i oprema

- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Indija)
- Soxhlet aparatura (Inko, Hrvatska)
- pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Metrohm, Švicarska)
- Vortex mješalica, tip VTX-3000L (Mixer UZUSIO, Japan)
- Sušionik (Inko, Hrvatska)
- Magnetska mješalica, MIX 15 eco (2mag AG, Njemačka)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velika Britanija)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VICTOR X3 (Perkin Elmer, SAD)
- PC računalo te softveri Microsoft Excel i GraphPad Prism 9

- Dijalizijska membrana, D9527-100FT, MWCO 14 000 Da (Sigma-Aldrich, SAD)
- Mikrotitarska ploča s 96 jažica

3.2. Metode

3.2.1. Mjerenje raspodjele veličine čestica

Određivanje raspodjele veličine čestica je iznimno bitno jer veličina nanočestica utječe na njihovu stabilnost, agregaciju, interakcije s otapalom, ali i njihovu biološku aktivnost. Metoda kojom se najčešće određuje veličina nanočestica je metoda dinamičkog raspršivanja svjetlosti (*eng. Dynamic Light Scattering – DLS*). Ona se temelji na Brownovom gibanju koje opisuje nasumično gibanje čestica suspendiranih u određenom tekućem ili plinovitom mediju. Promatraju se promjene intenziteta raspršene svjetlosti u ovisnosti o vremenu koje se događaju nakon što je sustav izložen laserskom zračenju. Veće čestice gibaju se sporije što rezultira promjenom intenziteta raspršene svjetlosti u većem vremenskom intervalu, dok je kod manjih čestica obrnuto; gibaju se brže pa do promjene intenziteta dolazi u manjem vremenskom intervalu. DLS-om se može izmjeriti translacijski difuzijski koeficijent (D) preko kojega se pomoću Stokes-Einsteinove jednadžbe može izračunati polumjer čestica. Matematički zapis Stokes-Einsteinove jednadžbe jest:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

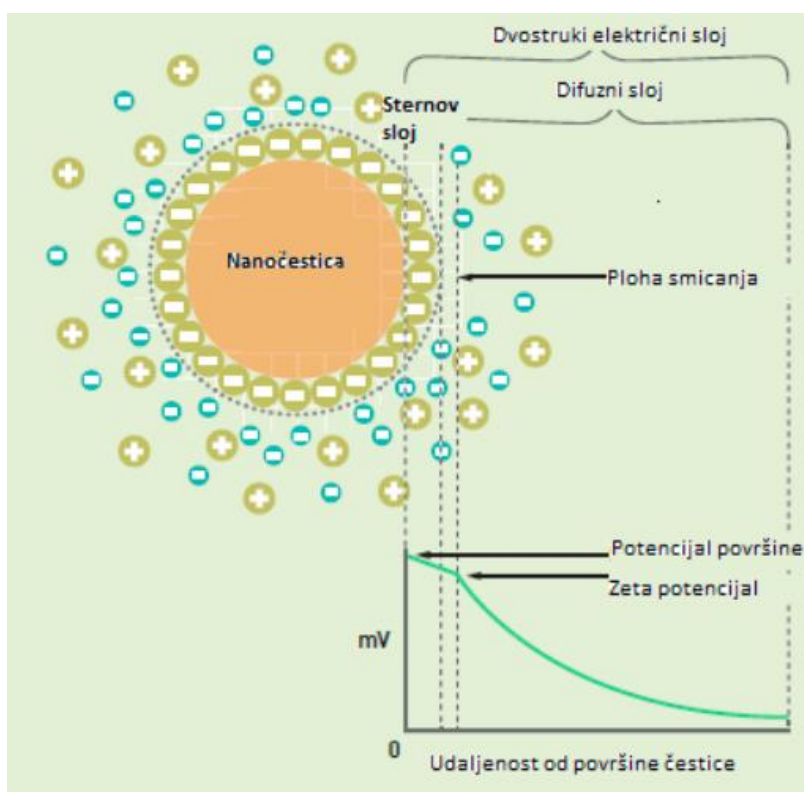
u kojemu R_H označava hidrodinamički polumjer čestice, k je Boltzmannova konstanta, T temperatura sustava u kelvinima, a η označava viskoznost disperznog sustava (Tosi i sur., 2020).

Za mjerenje veličine čestica korišteni su nerazrijeđeni uzorci unutar 24 sata od završetka postupka pročišćavanja dijalizom.

3.2.2. Određivanje zeta potencijala

Sve nabijene nanočestice u otopini imaju tzv. Sternov omotač kojega čine ioni suprotnog naboja snažno vezani za površinu same nanočestice. Čestice također imaju i drugi difuzni vanjski omotač koji se sastoji od slabo vezanih iona te zajedno sa Sternovim omotačem čini električni dvosloj. Kako se čestica giba kroz tekućinu stvara se razlika između iona u difuznom sloju koji se kreću s nanočesticom i iona koji ostaju u disperznom sredstvu te nastaje elektrostatički

potencijal koji se naziva zeta potencijal (Clogston i Patri, 2011). Na Slici 1 vidi se slikoviti prikaz nanočestice, njezinog dvosloja i zeta potencijala.



Slika 1. Slikoviti prikaz nanočestice (Preuzeto s <https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma%3A600/datastream/PDF/view>)

Određivanje zeta potencijala je važno kako bi se mogla predvidjeti stabilnost nanočestice. Općenito, veći zeta potencijal može ukazivati na veću stabilnost suspenzije. Vrijednosti zeta potencijala i odgovarajuće stabilnosti čestica prikazane su u Tablici 2 (Kumar i Dixit, 2017).

Tablica 2. Povezanost stabilnosti nanočestica i zeta potencijala

Vrijednost zeta potencijala (mV)	Stabilnost
0 – ± 5	flokulacija ili koagulacija
±10 – ± 30	slaba stabilnost
±30 – ± 40	srednja stabilnost
±40 – ± 60	dobra stabilnost
> ± 60	odlična stabilnost

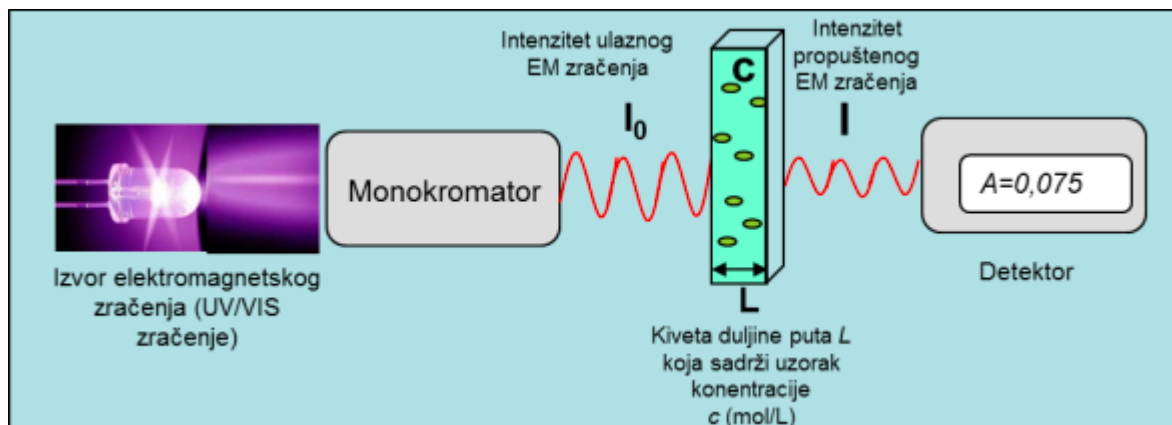
Zeta potencijal u ovom istraživanju određen je pomoću metode elektroforetskog raspršenja svjetlosti, što je ujedno i najčešća metoda mjerenja elektroforetske pokretljivosti nanočestica koja je indikator prosječnog zeta potencijala. Načelo metode zasniva se na činjenici da nabijena nanočestica u prisustvu električnog polja putuje prema suprotno nabijenoj elektrodi gdje biva osvijetljena laserskom svjetlosnom zrakom. Brzina čestice određuje se iz frekvencijskoga pomaka laserske svjetlosne zrake, a mobilnost se izračuna kao omjer brzine čestice i jakosti električnog polja (Sikora i sur., 2015).

Kao i kod mjerenja veličine čestica, analiza ovom metodom provedena je bez prethodnog razrjeđivanja uzoraka.

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja nanoselena

UV-Vis spektrofotometrija je primarno kvantitativna analitička metoda u čijoj srži se nalazi apsorpcija elektromagnetskog zračenja vidljivog i ultraljubičastog dijela spektra. Ultraljubičasti dio spektra nalazi se na valnim duljinama 190 – 380 nm, dok se vidljivi dio spektra nalazi u području valnih duljina 380 – 800 nm. Valna duljina pri kojoj će molekula apsorbirati elektromagnetsko zračenje ovisi o jakosti veze kojom su vezani njezini elektroni. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja ti elektroni prelaze iz osnovnog elektronskog stanja u jednu od vibracijskih i rotacijskih razina pobuđenog stanja. U navedene prijelaze, pri valnim duljinama koje odgovaraju vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra, gotovo uvijek ulaze π elektroni konjugiranih dvostrukih veza.

Instrument kojim se provodi analiza spektra elektromagnetskog zračenja naziva se spektrofotometar, a njegovi sastavni dijelovi su: izvor elektromagnetskog zračenja, monokromator, nosač uzorka i detektor zračenja (Slika 2).



Slika 2. Princip rada UV-Vis spektrofotometra

(Preuzeto s

<https://repositorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A402/datastream/PDF/view>)

Pri analizi uzorak biva obasjan elektromagnetski zračenjem. Dio zračenja uzorak apsorbira, a detektor spektrofotometra mjeri intenzitet propuštenog tj. neapsorbiranog zračenja te ga uspoređuje s intenzitetom ulaznog zračenja. Logaritam omjera ulaznog zračenja (I_0) i izmjenog zračenja (I) naziva se apsorbancijom. Apsorbancija je prema Beer-Lambertovom zakonu proporcionalna s koncentracijom uzorka koji se određuje. Sam Beer-Lambertov zakon glasi:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cl$$

gdje A označava apsorbanciju na danoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ molarni apsorpcijski koeficijent ($L/mol\cdot cm$), l duljinu puta zračenja kroz uzorak (cm), a c je molarna koncentracija tvari u otopini (mol/L) (Watson, 1999).

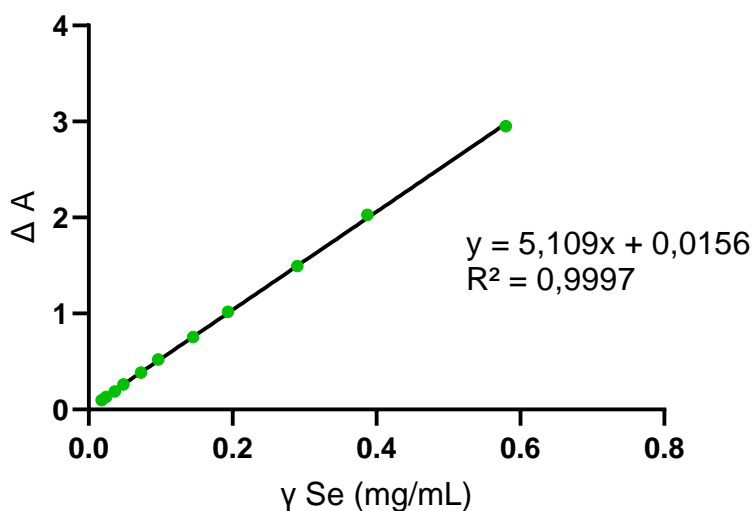
U ovom istraživanju otopine poznatih koncentracija natrijeva selenita prevedene su u nanoselen metodom ranije opisane zelene sinteze te je mjerena apsorbancija na 405 nm. Priprema koncentracijskog niza prikazana je u Tablici 3.

Tablica 3. Shema pripreme ispitivanih otopina

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	B
V (uzoraka) / μL	200	133,5	100	66,75	50	33,38	25	16,69	12,5	8,35	6,25	0
V (deionizirane vode) / μL	0	66,5	100	133,25	150	166,62	175	183,31	187,5	191,65	193,75	200

R1 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,58 mg/mL; R2 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,39 mg/mL; R3 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,29 mg/mL; R4 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,19 mg/mL; R5 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,15 mg/mL; R6 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,097 mg/mL; R7 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,073 mg/mL; R8 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,048 mg/mL; R9 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,036 mg/mL; R10 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,024 mg/mL; R11 – otopina u kojoj je koncentracija uzorka 0,018 mg/mL; B – slijepa proba (koncentracija uzorka je 0 mg/mL)

Izmjerene vrijednosti apsorbancija različitih koncentracija selena u otopini umanjene su za srednju vrijednost izmjerene apsorbancije slijepa probe (deionizirana voda). Pomoću dobivenih vrijednosti razlika apsorbancija i ishodnih vrijednosti koncentracija selena u otopinama napravljen je baždarni dijagram (Slika 3).



Slika 3. Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nanoselena u uzorku

Dobiveni pravac korišten je za izračunavanje koncentracija nanoselena u ispitivanim uzorcima budući da su rezultati antioksidacijskih mjerenja izraženi kao Trolox-a po količini nanoselena (za TEAC metodu) odnosno galne kiseline po količini nanoselena (za Folin-Ciocalteu metodu).

3.2.4. Ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metodom

U TEAC metodi ABTS radikal kation biva neutraliziran antioksidansom iz uzorka što uzrokuje smanjenje apsorbancije. Metoda je jednostavna, brza te je pogodna za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta uzoraka (Zhong i sur., 2015).

Uzorke koji sadrže nanočestice seleno najprije je potrebno dobro izmiješati, a zatim razrijediti četiri puta deioniziranom vodom te u jažice pipetirati po 20 μL odgovarajućeg uzorka ili deionizirane vode u triplicatu te potom u svaku jažicu dodati po 200 μL otopine ABTS radikala. Nakon toga slijedi 60 sekundi mućkanja te 90 sekundi inkubacije na temperaturi od 30 °C. Zadnji korak je mjerenje apsorbancije na valnoj duljini od 750 nm.

Korištena otopina ABTS radikala napravljena je tako da se najprije ABTS otopi u odgovarajućem volumenu deionizirane vode kako bi konačna koncentracija otopine bila 7 mmol/L. Zatim se $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ otopi u deioniziranoj vodi kako bi konačna koncentracija bila 2,45 mmol/L. Za dobivanje otopine ABTS radikala potrebno je pomiješati jednake volumene neposredno prije izrađenih otopina ABTS-a i kalijeva persulfata. Otopinu je potrebno držati 12 – 16 h u mraku prije korištenja kako bi se osigurala potpuna oksidacija ABTS-a i nastajanje dovoljne količine radikala (Re i sur., 1999).

3.2.5. Ispitivanje ukupnog reduksijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfomolibden i fosfovolfram kiseline u kojima se molibden i volfram nalaze u oksidacijskom stanju VI+. Metoda je bazirana na sposobnosti fenolnih skupina da u alkalnim uvjetima reduciraju molibden i volfram, koji prelaze u oksidacijsko stanje V+, pri čemu nastaju volfram i molibden plavila. Iako se metoda originalno koristila za analizu proteina, zbog činjenice da je tirozin fenolna aminokiselina i može se mjeriti na ovaj način, u srži metode je oksidacijsko reduksijski proces pa se njena upotreba može proširiti na ispitivanje ukupnog reduksijskog potencijala praktički bilo kojeg uzorka što se danas i radi (Ikawa i sur., 2003).

10%-tna otopina Folin-Ciocalteu reagensa koji se koristi u ovoj metodi pripremi se adekvatnim razrjeđivanjem originalnog reagensa deioniziranom vodom.

Uzorke koji sadrže nanočestice seleno najprije je potrebno dobro izmiješati, a zatim razrijediti četiri puta deioniziranom vodom te u jažice pipetirati po 20 μL svakog uzorka ili deionizirane vode u triplicatu. Nakon toga dodaje se 50 μL prethodno pripremljenog Folin reagensa i smjesa se inkubira na temperaturi od 37 °C tijekom 5 minuta. Potom je potrebno u svaku jažicu dodati

160 μL vodene otopine natrijevog karbonata koncentracije 0,7 mol/L nakon čega se mikrotitarska ploča inkubira na 37 °C kroz trideset minuta te se po isteku tog vremena mjeri apsorbanacija na valnoj duljini od 750 nm (Ainsworth i Gillespie, 2007).

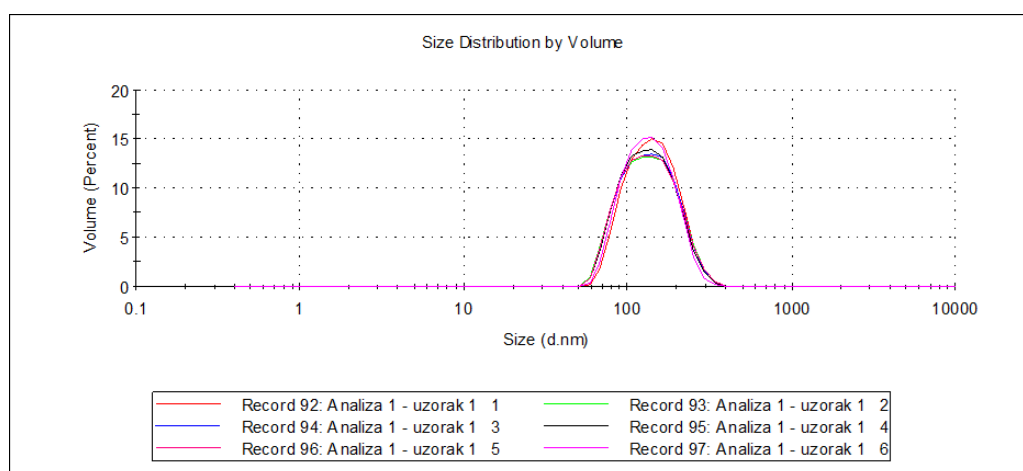
3.2.6. Statistička analiza

Sve navedene metode rađene su u triplikatu, a metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti u heksaplikatu. Analiza navedenih podataka i izrada grafičkih prikaza provedena je pomoću GraphPad Prism 9 programskog paketa. Rezultati su međusobno uspoređivani korištenjem jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) s post hoc Tukey testom, a vrijednosti $p \leq 0,05$ pokazuju statistički značajnu razliku između uzoraka.

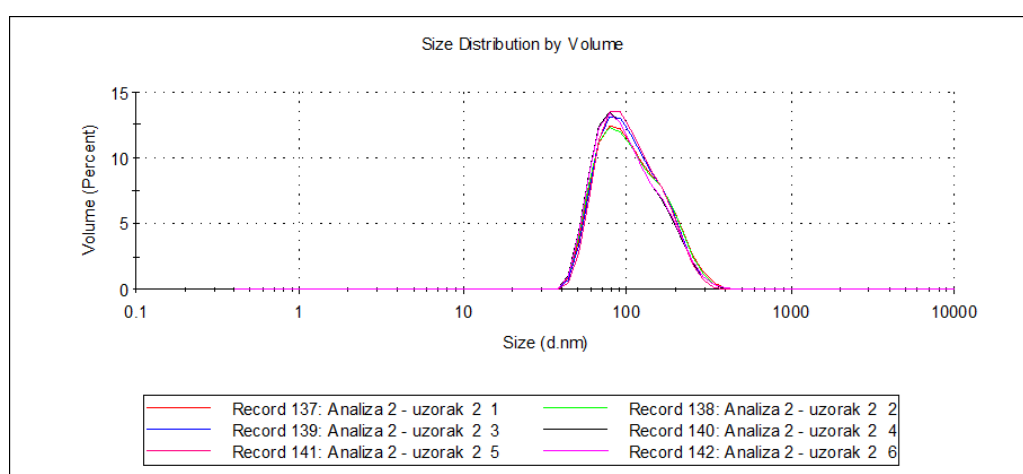
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Veličina nanočestica

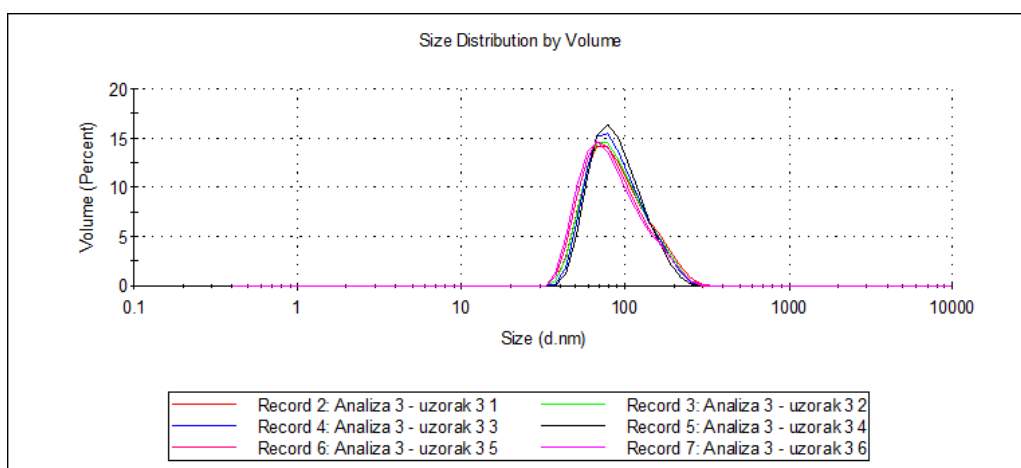
Rezultati analize veličine čestica prikazani su na Slikama 4 – 16. Na navedenim grafičkim prikazima vidljiv je po jedan jasan pik za svaku reakcijsku smjesu te relativno uske baze što ukazuje na unimodalnu i ne preširoku raspodjelu veličine čestica, uz ravan ostatak bazne linije. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da pektin možemo smatrati dobrim inkapsulacijskim sredstvima za zelenu sintezu nanočestica selena te da je proces čišćenja reakcijske smjese nanoselena dijalizom učinkovit.



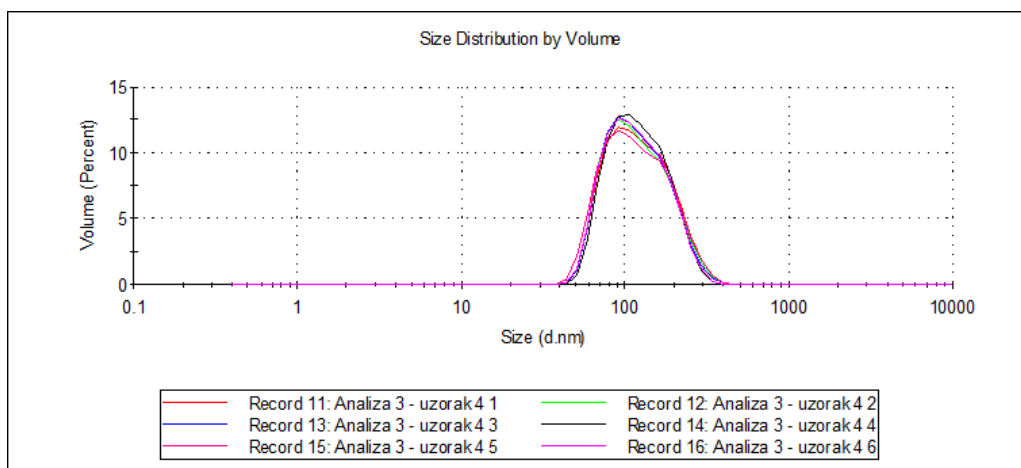
Slika 4. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 0,100 mg/mL



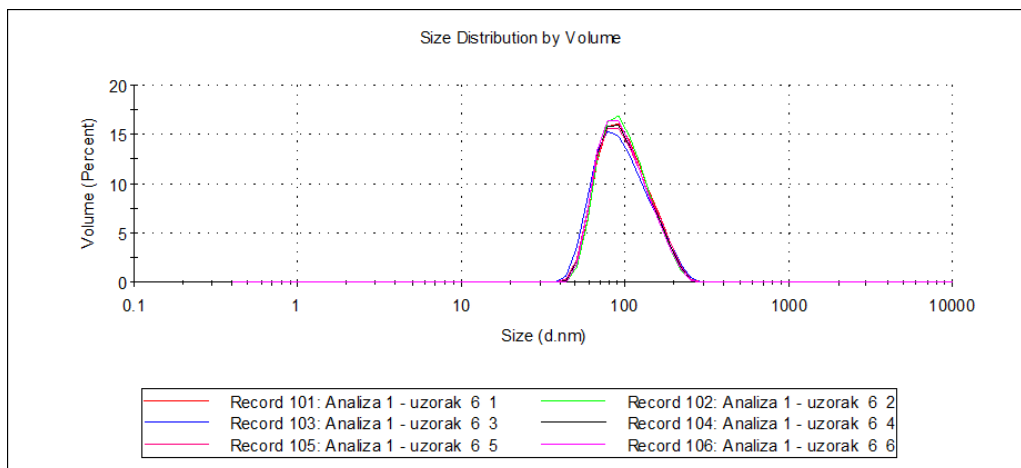
Slika 5. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 0,200 mg/mL



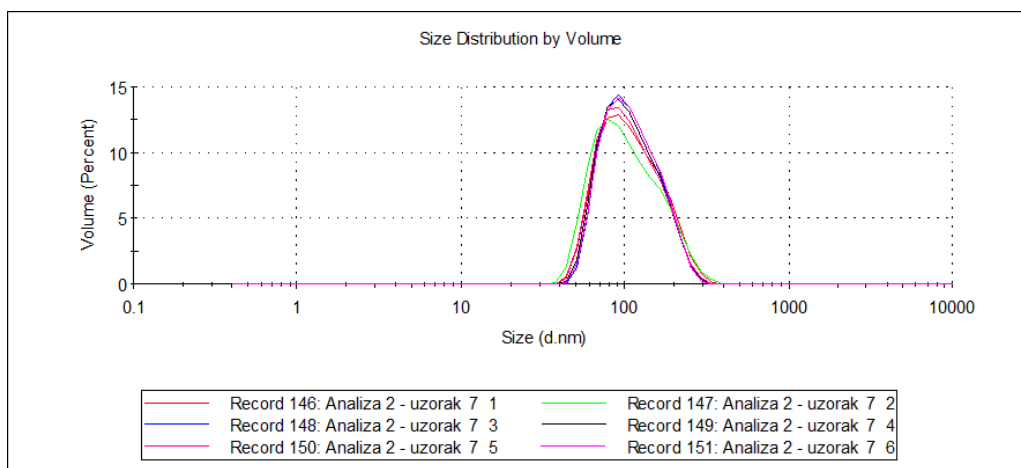
Slika 6. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 0,517 mg/mL



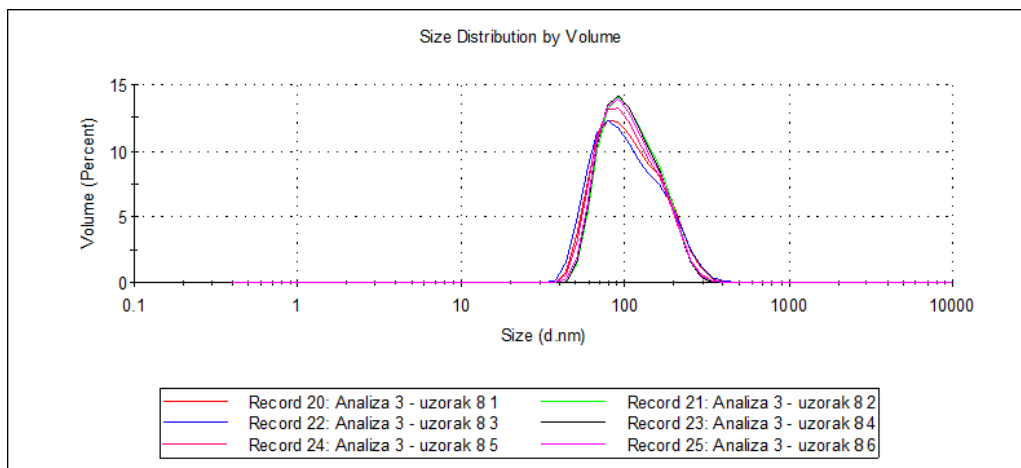
Slika 7. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 1,03 mg/mL



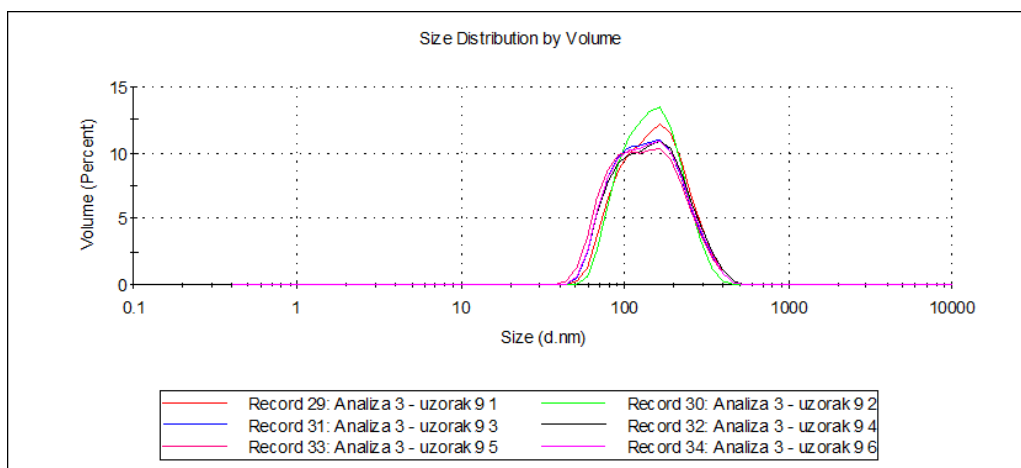
Slika 8. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 0,100 mg/mL



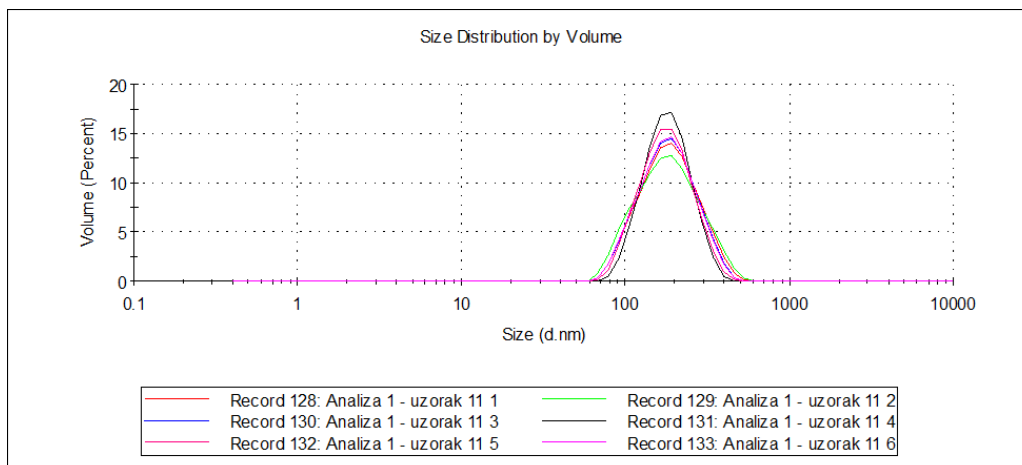
Slika 9. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 0,200 mg/mL



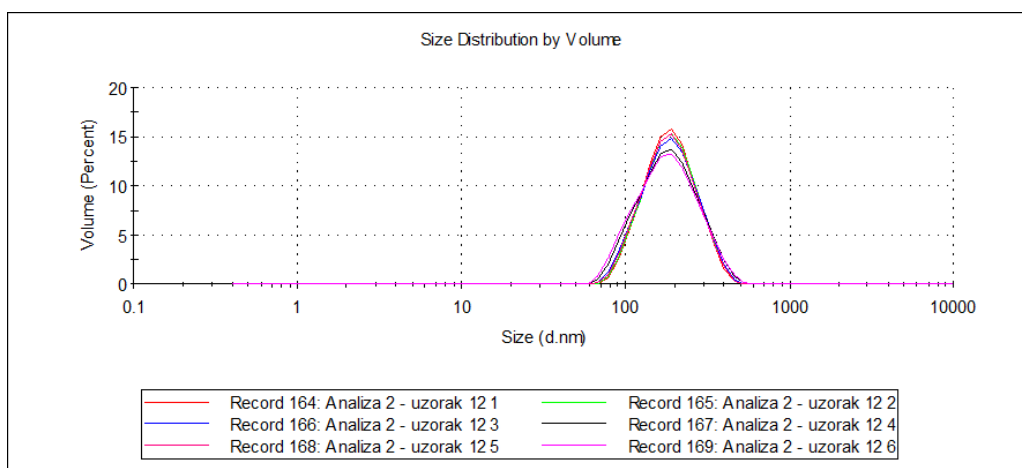
Slika 10. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 0,517 mg/mL



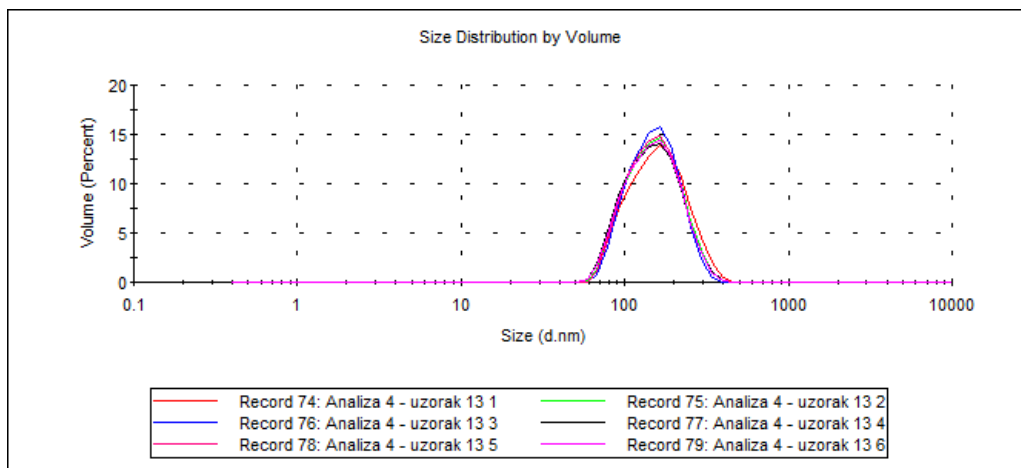
Slika 11. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice čija je koncentracija 1,03 mg/mL



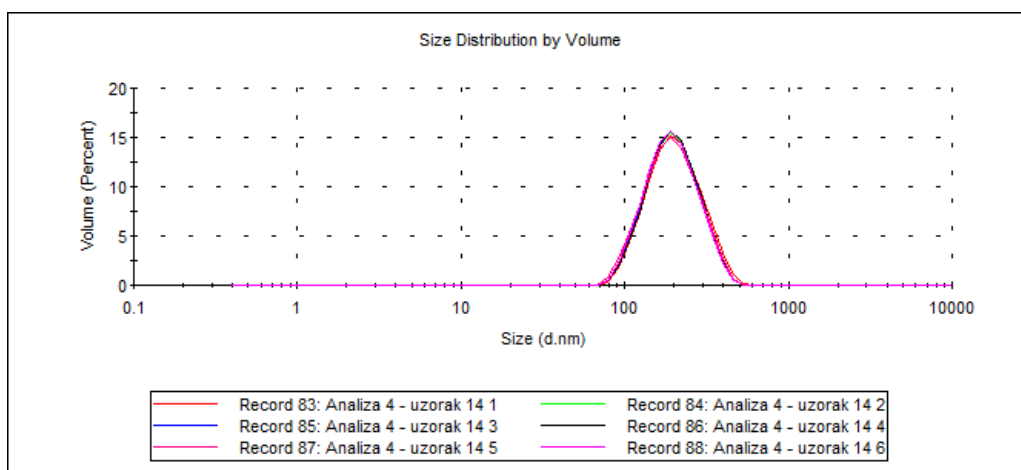
Slika 12. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina čija je koncentracija 0,100 mg/mL



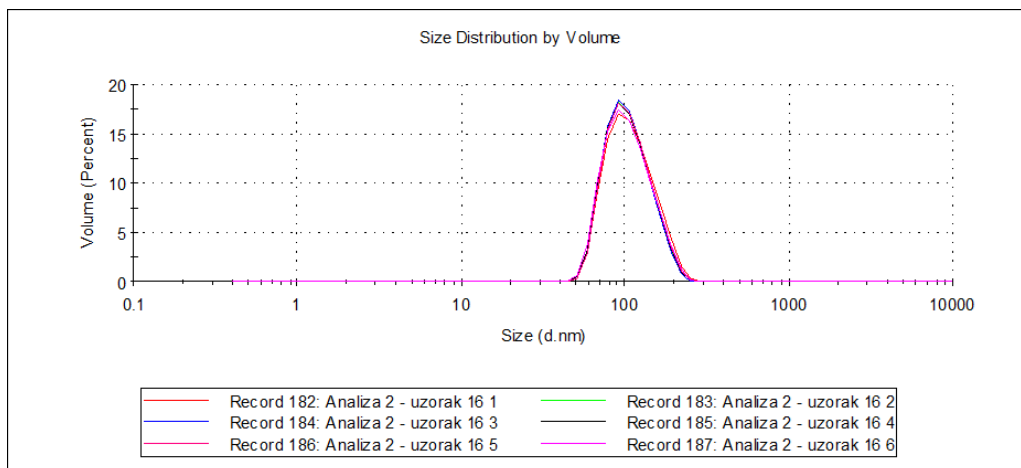
Slika 13. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina čija je koncentracija 0,200 mg/mL



Slika 14. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina čija je koncentracija 0,517 mg/mL

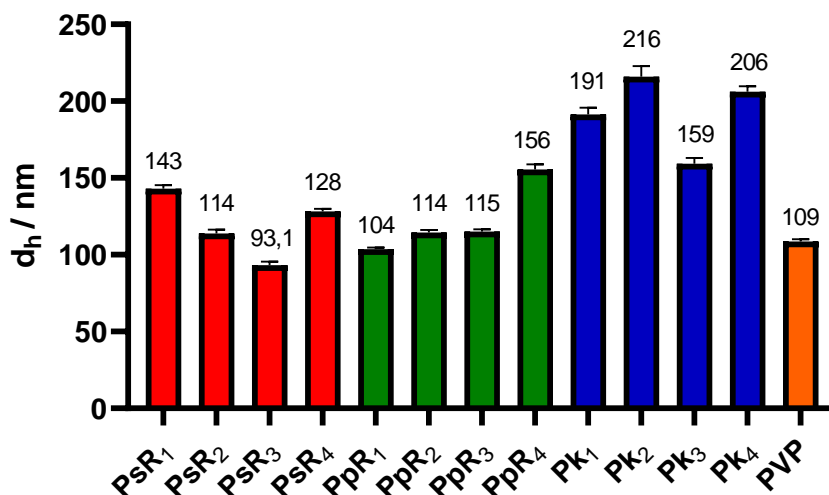


Slika 15. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina čija je koncentracija 1,03 mg/mL



Slika 16. Grafički prikaz raspodjele veličine čestica po volumenu za uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona čija je koncentracija 1,00 mg/mL

Na Slici 17 prikazani su srednji promjeri nanočestica selena u ovisnosti o vrsti i koncentraciji primijenjenog inkapsulacijskog sredstva te standardne devijacije koje ukazuju na zadovoljavajuću ponovljivost mjerenja.



Slika 17. Srednji promjeri nanočestica u ispitivanim uzorcima

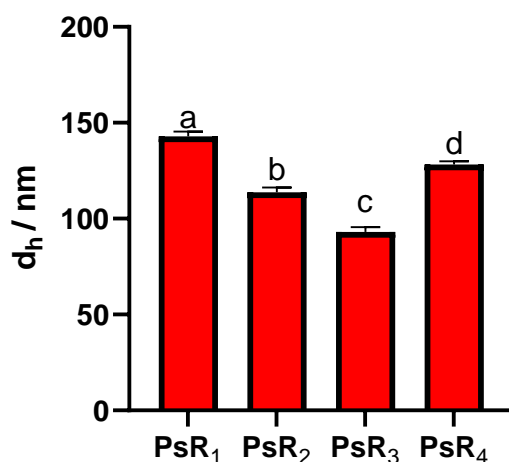
PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PVP – uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona (koncentracija PVP-a je 1,00 mg/mL)

Na Slici 17 vidljivo je da vrsta i koncentracija inkapsulacijskog sredstva bitno utječu na srednji promjer nastalih nanočestica selena, a izmjerene veličine kretale su se od 93,1 nm (PsR₃) do 216 nm (Pk₂). Općenito govoreći, frakcije sirovog i pročišćenog pektina komine rajčice primjene u odgovarajućoj koncentraciji daju čestice nanoselena srednjeg promjera usporedivog s onim koji imaju čestice nanoselena nastale kemijskom sintezom uz korištenje sintetskih inkapsulacijskih sredstava. To je iznimno povoljan rezultat ne samo zato što bi pektini mogli zamijeniti sintetska inkapsulacijska sredstva poput polivinilpirolidona u sintezi nanočestica selena, nego i zbog toga što proces pročišćavanja pektina u pripremi uzoraka oduzima mnogo

vremena. Korištenje sirovog pektina umjesto pročišćenog uvelike bi moglo pojednostaviti postupak prerade komine rajčice sa svrhom izolacije pektina.

S druge strane, primjena komercijalnog pektina rezultira nastajanjem znatno većih nanočestica, neovisno o njegovoj primijenjenoj koncentraciji.

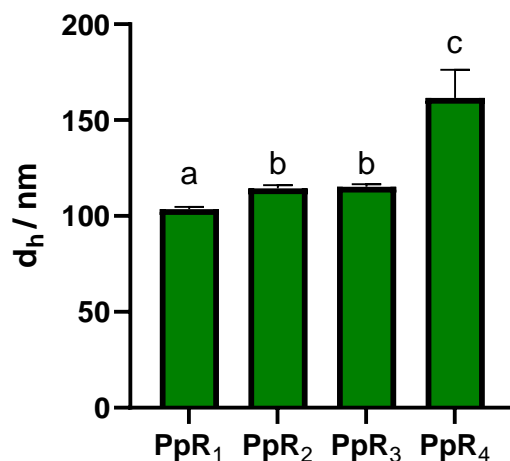
Statističkom usporedbom podataka dolazi se do zaključka da koncentracija sirovog pektina u uzorku značajno utječe na promjer nanočestica i to na način da povećanje koncentracije pektina do 0,517 mg/mL smanjuje promjer čestica, a čestice u uzorku s najvišom koncentracijom pektina ponovo imaju veći promjer (Slika 18). Kao što je u uvodu objašnjeno optimalna veličina nanočestica jest oko 100 nm, uzimajući u obzir zadovoljavajuću biorasploživost i nisku toksičnost. Iz toga se može zaključiti da su nanočestice selena u uzorku gdje je koncentracija sirovog pektina 0,517 mg/mL optimalne veličine dok su nanočestice pripremljene sa sirovim pektinom koncentracije 0,200 mg/mL zadovoljavajuće veličine.



Slika 18. Utjecaj koncentracije sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice na veličinu nanočestica selena

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL);

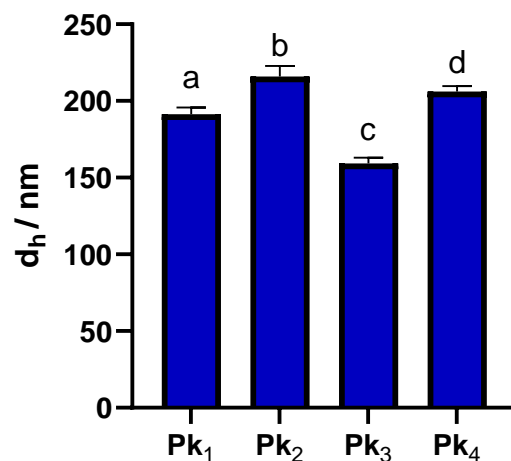
Kod nanočestica s omotačem pročišćenog pektina situacija je nešto drugačija nego kod onih s omotačem sirovog pektina. Naime, u ovom slučaju veličina čestica raste povećanjem koncentracije pektina (Slika 19), a u uzorcima u kojima je koncentracija pročišćenog pektina 0,100 mg/mL, 0,200 mg/mL i 0,517 mg/mL su nastale čestice zadovoljavajuće veličine.



Slika 19. Utjecaj koncentracije pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice na veličinu nanočestica selena

PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03mg/mL)

Što se tiče nanočestica kod kojih je inkapsulacijsko sredstvo bio komercijalan pektin, vidljivo je da na veličinu čestica utječe koncentracija pektina u uzorku, međutim nema nekakve pravilnosti (Slika 20). Bez obzira na nedostatak pravilnosti može se zaključiti da su čak i nanočestice u uzorku gdje je koncentracija komercijalnog pektina bila 0,517 mg/mL, koje su po veličini najmanje u promjeru, prevelike.



Slika 20. Utjecaj koncentracije komercijalnog pektina na veličinu nanočestica selena

Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL)

Hileuskaya i sur. (2020) u svojem su radu koristili pektin kao inkapsulacijsko sredstvo, ali u sintezi nanočestica srebra te su istraživali kako koncentracija pektina mijenja svojstva nanočestica. Rezultati njihovog eksperimentalnog rada pokazuju da veće povećanje koncentracije pektina značajno povećava promjer nanosrebra, što je dosljedno rezultatima dobivenim u ovome radu. Qiu i sur. (2018) također su u svom istraživanju koristili pektin kao omotač za nanočestice, ali ne srebra nego upravo selena. Njihovi rezultati dobiveni DLS metodom ponovo su sukladni rezultatima izloženim u ovome radu: povećanje koncentracije do određene vrijednosti utječe povoljno na veličinu čestica (smanjuje ju), a daljnje povećanje koncentracije pektina povećava promjer nanoselena.

4.2. Zeta potencijal nanočestica

Srednja vrijednost izmjerenog zeta potencijala uzoraka, njegove standardne (SD) i relativne standardne devijacije (RSD) koje ukazuju na točnost mjerenja prikazane su u Tablici 4.

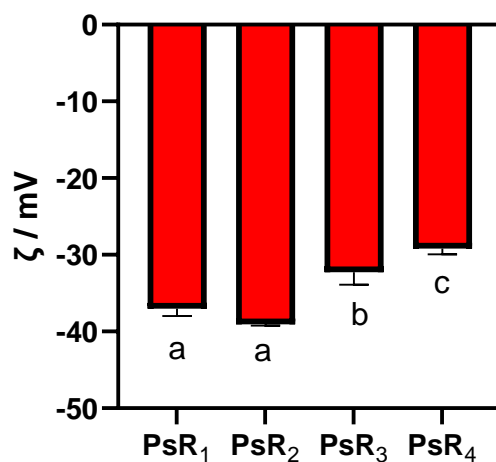
Tablica 4. Izmjeren zeta potencijal ispitivanih uzoraka

oznaka uzorka	ζ / mV	SD	RSD
PsR ₁	-37,0	0,961	2,59
PsR ₂	-39,1	0,153	0,39
PsR ₃	-32,3	1,63	5,04
PsR ₄	-29,2	0,755	2,59
PpR ₁	-38,0	0,808	2,13
PpR ₂	-37,4	0,416	1,11
PpR ₃	-32,4	1,32	4,07
PpR ₄	-29,5	1,56	5,27
Pk ₁	-39,6	0,608	1,54
Pk ₂	-39,1	0,361	0,92
Pk ₃	-33,2	0,833	2,51
Pk ₄	-35,5	0,500	1,41
PVP	-24,4	0,404	1,65

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03mg/mL); Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija petina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PVP – uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona (koncentracija PVP-a je 1,00 mg/mL)

Statistička usporedba podataka uzoraka s različitom koncentracijom sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice pokazuje da pri niskim koncentracijama pektina (0,100 i 0,200 mg/mL) nema statistički značajne razlike između zeta potencijala dobivenih nanočestica, ali daljnjim povećanjem koncentracije pektina zeta potencijal raste (Slika 21). Uzevši u obzir vrijednosti

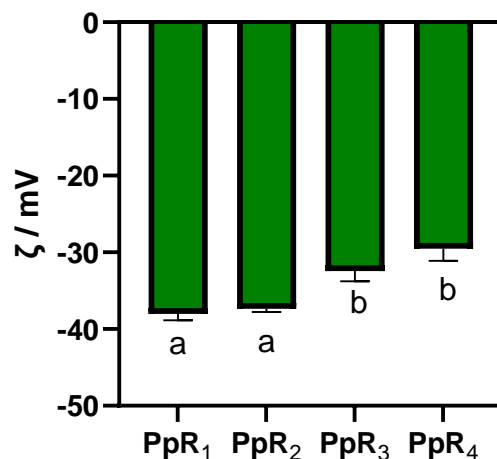
zeta potencijala pri svim koncentracijama moguće je zaključiti da su upravo uzorci koji sadrže najniže koncentracije pektina oni u kojima su nastale nanočestice najveće stabilnosti.



Slika 21. Utjecaj koncentracije sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice na zeta potencijal nanočestica selena

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL)

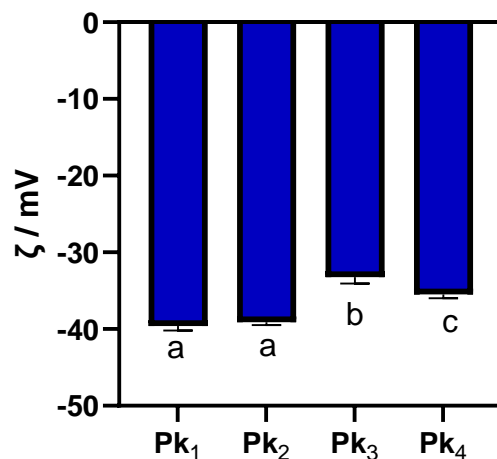
Jednako kao i kod čestica s omotačem sirovog pektina, nanočestice koje za omotač imaju pročišćen pektin izoliran iz komine rajčice pri najnižim koncentracijama pektina pokazuju statistički jednak zeta potencijal koji pokazuje da upravo te čestice imaju najveću stabilnost. Pri višim koncentracijama pektina stabilnost čestica znatno opada tj. zeta potencijal raste (Slika 22).



Slika 22. Utjecaj koncentracije pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice na zeta potencijal nanočestica selena

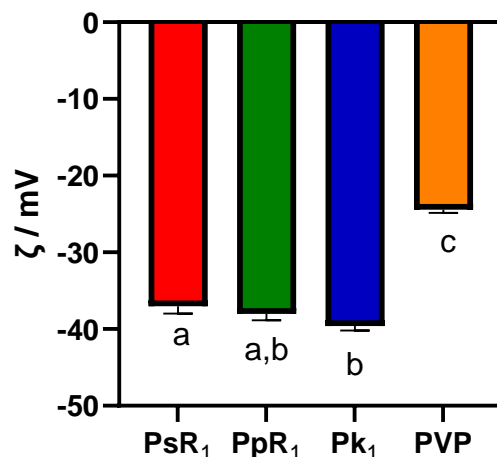
PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03mg/mL)

Kod nanoselena čije je inkapsulacijsko sredstvo bio komercijalan pektin rezultati su dosljedni prethodnima: u uzorcima gdje je koncentracija pektina bila 0,100 i 0,200 mg/mL zeta potencijal je jednak i najniži što odgovara najvećoj stabilnosti čestica, a porastom koncentracije pektina smanjuje se stabilnost (Slika 23).



Slika 23. Utjecaj koncentracije komercijalnog pektina na zeta potencijal nanočestica selena
 Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL)

Između zeta potencijala čestica u uzorcima u kojima je koncentracija sirovog i pročišćenog pektina bila 0,100 mg/mL nema statistički značajne razlike, a isto tako nema statistički značajne razlike između zeta potencijala u uzorcima s koncentracijom pročišćenog i komercijalnog pektina 0,100 mg/mL (Slika 24). Također, prema njihovim vrijednostima zeta potencijala, sve navedene čestice s omotačem pektina mogu se svrstati u čestice srednje stabilnosti, ali nalaze se na samoj gornjoj granici prema česticama s dobrom stabilnosti, dok čestice s omotačem polivinilpirolidona spadaju u nanočestice slabe stabilnosti. Iz toga se može zaključiti da je pektin, uzimajući u obzir izmjereni zeta potencijal, bolje inkapsulacijsko sredstvo nego polivinilpirolidon.



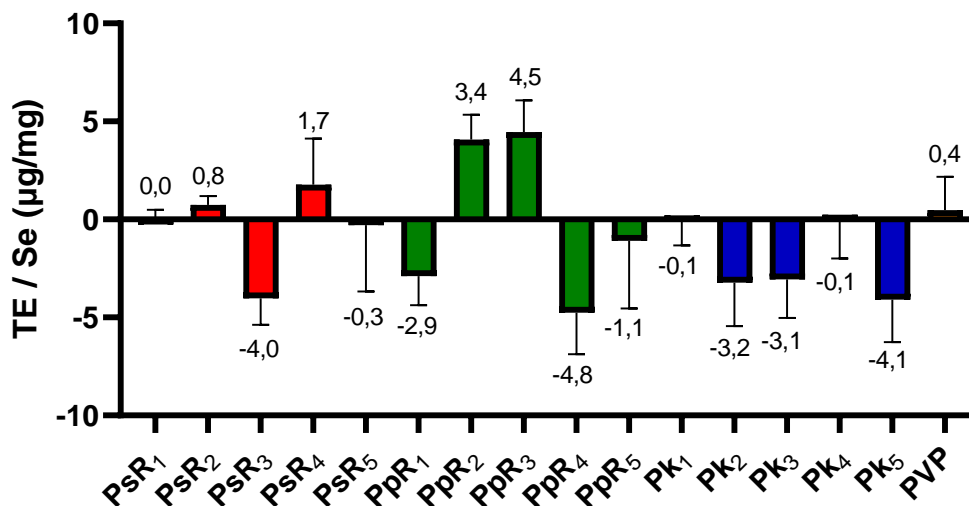
Slika 24. Utjecaj vrste inkapsulacijskog sredstva na zeta potencijal nanočestica selena

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija petina je 0,100 mg/mL); PVP – uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona (koncentracija PVP-a je 1,00 mg/mL)

Zeta potencijal za nanosrebro s omotačem pektina, prema Hileuskaya i sur. (2020), iznosi -35 mV ili više za sve čestice, bez obzira na koncentraciju pektina. Također, zeta potencijal nanoselena s omotačem pektina iznosi više od -30 mV prema Qiu i sur. (2018). Zeta potencijal nanoselena s omotačem pektina iz komine rajčice ne odstupa mnogo od zeta potencijala izmjenjenog u navedenim istraživanjima što ponovo pokazuje da je taj pektin dobro inkapsulacijsko sredstvo koje bi moglo naći svoju ulogu u sintezi metalnih nanočestica.

4.3. TEAC antiradikalna učinkovitost

Izmjerene vrijednosti apsorbancija uzoraka umanjene su za srednju vrijednost izmjerenih vrijednost apsorbancija slijepih proba te su dobiveni rezultati uvršteni u jednadžbu kalibracijske krivulje standarda Troloxa kako bi se dobili ekvivalenti Trolox-a po količini nanoselena sadržani u svakom pojedinom uzorku (Slika 25).

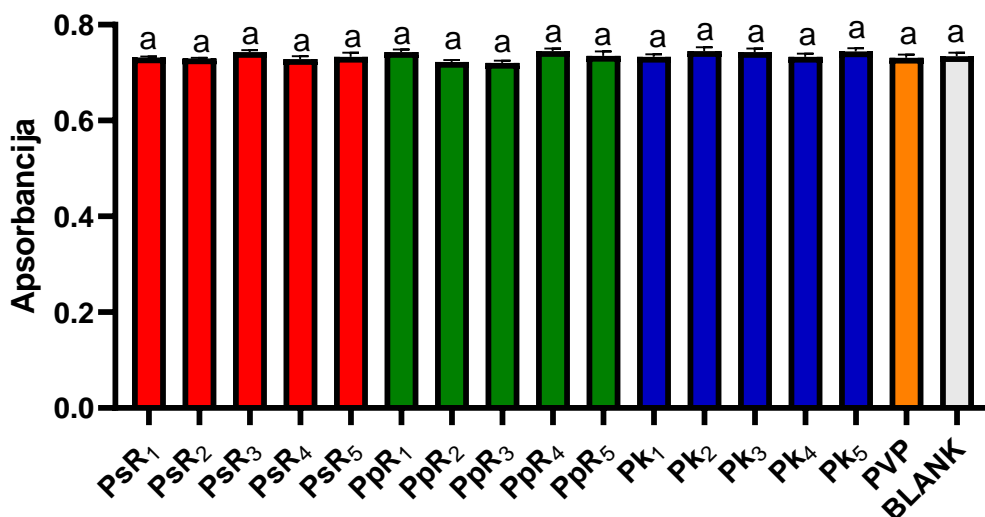


Slika 25. Antioksidacijski kapaciteti nanočestica u ispitivanim uzorcima izraženi kao ekvivalenti Trolox-a po količini nanoselena

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PsR₅ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03mg/mL); PpR₅ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija petina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); Pk₅ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,86 mg/mL); PVP – uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona (koncentracija PVP-a je 1,00 mg/mL)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da većina uzoraka ne posjeduje antiradikalnu učinkovitost, a oni čije su vrijednosti pozitivne imaju minimalnu, gotovo zanemarivu antiradikalnu učinkovitost. Dodatno je napravljena statistička usporedba početno dobivenih apsorbancija tako da je set apsorbancija svakog uzorka uspoređen sa setom apsorbancija slijepih proba. Analiza,

prikazana na Slici 26, je pokazala da nema statistički značajne razlike između tih apsorbancija što znači da niti jedan od ispitivanih uzoraka nema značajan antioksidacijski potencijal.

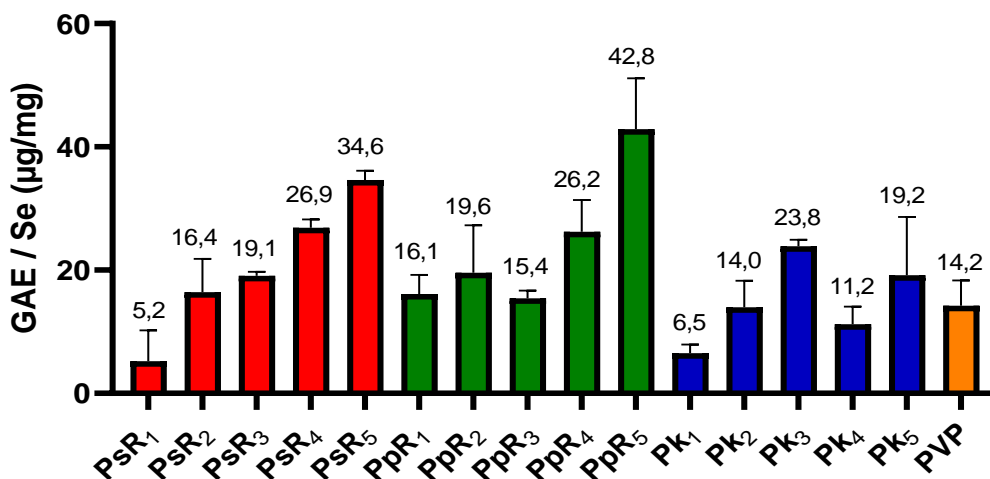


Slika 26. Usporedba apsorbancija ispitivanih uzoraka i slijepe probe

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PsR₅ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03mg/mL); PpR₅ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija petina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); Pk₅ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,86 mg/mL); PVP – uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona (koncentracija PVP-a je 1,00 mg/mL); BLANK – slijepa proba (deionizirana voda)

4.4. Ukupan redukcijski potencijal

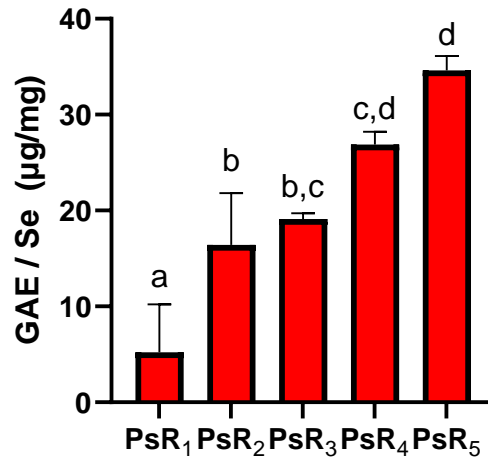
Kao i u prethodnoj metodi, izmjerene vrijednosti apsorbancija uzoraka umanjene su za srednju vrijednost izmjerenih vrijednosti apsorbancija slijepih proba te su dobiveni rezultati uvršteni u jednadžbu baždarnog pravca kako bi se izračunao ukupni redukcijski potencijal izražen kao ekvivalenti galne kiseline (Slika 27).



Slika 27. Ukupni redukcijski potencijali nanočestica u ispitivanim uzorcima izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po količini nanoselena

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PsR₅ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03mg/mL); PpR₅ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija petina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); Pk₅ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,86 mg/mL); PVP – uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona (koncentracija PVP-a je 1,00 mg/mL)

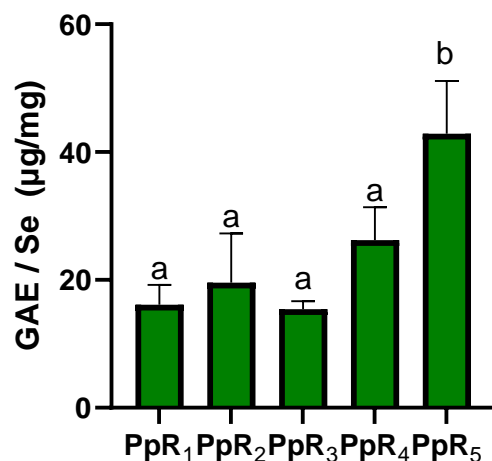
Iz podataka dobivenih za nanočestice s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice vidljivo je da uzorci imaju to veći ukupni redukcijski potencijal izražen kao ekvivalenti galne kiseline po količini nanoselena što je viša koncentracija pektina u uzorku (Slika 28).



Slika 28. Utjecaj koncentracije sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice na ukupni redukcijski potencijal (izražen kao ekvivalenti galne kiseline po količini nanoselena) nanočestica selena

PsR₁ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PsR₂ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PsR₃ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PsR₄ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); PsR₅ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL)

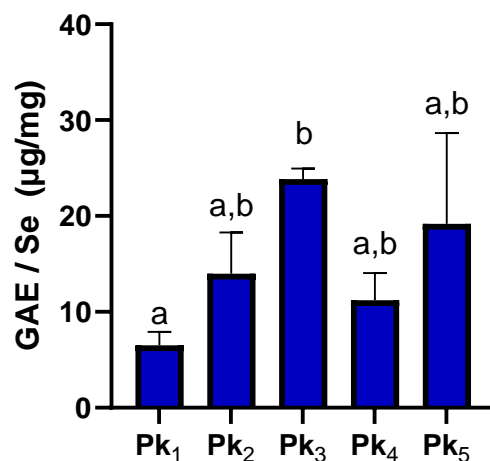
Statističkom usporedbom podataka pokazano je da postoji statistički značajna razlika između ukupnog redukcijskog potencijala uzoraka u kojima je najviša koncentracija pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice od ostalih nižih koncentracija istog pektina koje statistički imaju sve jednaki rezultat (Slika 29). Također, obradom rezultata dolazi se do zaključka da uzorak koji sadrži pročišćen pektin komine rajčice u koncentraciji 1,81 mg/mL ima viši ukupni redukcijski potencijal izražen kao ekvivalenti galne kiseline po količini nanoselena od svih ostalih uzoraka.



Slika 29. Utjecaj koncentracije pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice na ukupni redukcijski potencijal (izražen kao ekvivalenti galne kiseline po količini nanoselena) nanočestica selena

PpR₁ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,100 mg/mL); PpR₂ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); PpR₃ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); PpR₄ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,03mg/mL); PpR₅ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL);

Podatci pokazuju nešto drugačiju sliku za komercijalni pektin. Porast udjela inkapsulacijskog sredstva 0,100 – 0,517 mg/mL doveo je do porasta redukcijskog potencijala nanoselena, a porast iznad 0,517 mg/mL nije rezultirao daljnjim porastom redukcijskog potencijala.

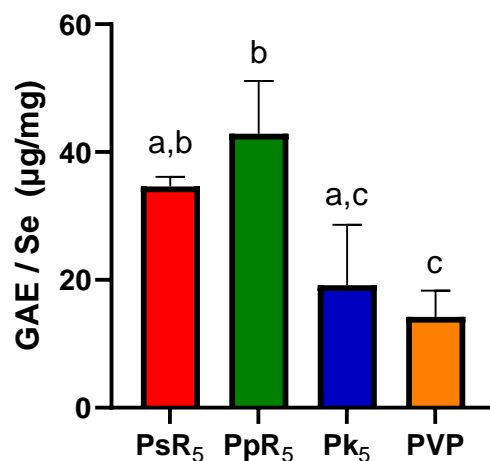


Slika 30. Utjecaj koncentracije komercijalnog pektina na ukupni redukcijski potencijal (izražen kao ekvivalenti galne kiseline po količini nanoselena) nanočestica selena

Pk₁ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija petina je 0,100 mg/mL); Pk₂ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,200 mg/mL); Pk₃ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 0,517 mg/mL); Pk₄ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,03 mg/mL); Pk₅ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,86 mg/mL)

Usporedba istih koncentracija, ali različitih vrsta pektina u uzorcima pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između ukupnog redukcijskog potencijala čestica kod kojih je inkapsulacijsko sredstvo bio sirovi pektin i čestica kod kojih su inkapsulacijska sredstva bili pročišćeni ili komercijalni pektin. Također, pektin izoliran iz komine rajčice pokazuje značajno viši ukupni redukcijski potencijal od čestica koje za omotač imaju polivinilpirolidon.

To je bitno jer su nanočestice koje su sintetizirane uz inkapsulacijsko sredstvo izolirano iz komine ne samo bolje od sintetskog polivinilpirolidona, nego i od komercijalnog pektina. Dakle postoji mogućnost, uz daljnja istraživanja, da se pektin izoliran iz otpada pri proizvodnji rajčice koristi kao zamjena za komercijalan pektin u zelenoj sintezi nanoselena.



Slika 31. Utjecaj vrste inkapsulacijskog sredstva na ukupni redukcijski potencijal (izražen kao ekvivalenti galne kiseline po količini nanoselena) nanočestica selena

PsR₅ – uzorak nanoselena s omotačem sirovog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); PpR₅ – uzorak nanoselena s omotačem pročišćenog pektina izoliranog iz komine rajčice (koncentracija pektina je 1,81 mg/mL); Pk₅ – uzorak nanoselena s omotačem komercijalnog pektina (koncentracija pektina je 1,86 mg/mL); PVP – uzorak nanoselena s omotačem polivinilpirolidona (koncentracija PVP-a je 1,00 mg/mL)

Visoka vrijednost ukupnog redukcijskog potencijala iznosi > 20 µg GAE/mg (Kähkönen i sur., 1999) što znači da ispitivani uzorci koji pripremljeni s višim koncentracijama pektina izoliranog iz komine rajčice (1,03 i 1,81 mg/mL) spadaju u tu skupinu dok ostali uzorci imaju slabiji redukcijski potencijal, pogotovo uzorci s najnižom koncentracijom (0,100 mg/mL) sirovog pektina komine rajčice i komercijalnog pektina.

5. ZAKLJUČCI

- Pektin komine rajčice primijenjen u koncentracijama 0,100 – 1,03 mg/mL pogodno je inkapsulacijsko sredstvo za formulaciju nanočestica selena, bez obzira na to radi li se o pročišćenju ili sirovom pektinskoj frakciji, usporedivo s komercijalnim pektinom te sintetskim inkapsulacijskim sredstvima poput polivinilpirolidona.
- Primjenom sirovog pektina komine rajčice u koncentraciji 0,100 – 1,03 mg/mL nastaju čestice nanoselena srednjeg raspona promjera 93,1 – 143 nm. Najmanje čestice nastaju kada je primijenjena koncentracija sirovog petina 0,517 mg/mL. Primjenom pročišćenog pektina komine rajčice u koncentraciji 0,100 – 1,03 mg/mL nastaju nanočestice selena srednjeg raspona promjera 104 – 156 nm; najmanje čestice nastaju primjenom inkapsulacijskog sredstva u najnižoj koncentraciji. Primjenom komercijalno dostupnog pektina nastaju čestice znatno većeg promjera (191 – 216 nm). Uzevši u obzir da je biorasploživost nanočestica ovisna o njihovoj veličini te značajno opada kad je prosječan promjer čestica veći od 100 nm, između ispitivanih inkapsulacijskih sredstava sirovi pektin rajčice u koncentraciji 0,517 mg/mL je najbolji.
- Primjenom sirovog pektina komine rajčice u koncentraciji 0,100 – 1,03 mg/mL nastaju nanočestice selena zeta potencijala -29,2 – -37,1 mV, a primjenom pročišćenog pektina komine rajčice nastaju čestice nanoselena zeta potencijala -29,5 – -38,0 mV što ih ubraja u čestice srednje-dobre stabilnosti, a rezultati su usporedivi s rezultatima dobivenim za komercijalni pektin (-35,5 – -39,6 mV). Kemijski sintetizirane nanočestice imale su znatno manji zeta potencijal (-24,4 mV).
- Provedenim mjerenjima zaključeno je da nanočestice selena ne pokazuju direktan antiradikalni potencijal, ali nanočestice u uzorcima s visokom koncentracijom pektina izoliranog iz komine rajčice imaju značajan redukcijski potencijal. Pri tome su najveći redukcijski potencijal imale nanočestice pripremljene korištenjem sirovog pektina komine rajčice, pogotovo u višim koncentracijama (0,517 mg/mL i 1,03 mg/mL).
- Uzevši u obzir dobivene rezultate, komina rajčice može se koristiti za izolaciju pektina koji bi služili kao inkapsulacijsko sredstvo u sintezi metalnih nanočestica.
- Preliminarni rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na moguće prednosti korištenja sirove pektinske frakcije komine rajčice u odnosu na pročišćenu frakciju, čime bi se mogla značajno pojednostaviti i olakšati izolacija pektina iz komine rajčice.
- Potrebna su daljnja istraživanja kojima će se dodatno usavršiti protokol sinteze nanočestica selena s ciljem dobivanja čestica visokog redukcijskog potencijala, a

promjera manjeg od 100 nm. Također je potrebno provesti istraživanja stabilnosti i bioraspoloživosti nanoselena dobivenog korištenjem pektina kumine rajčice kao inkapsulacijskog sredstva.

6. LITERATURA

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

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

Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. U: *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. McNeil SE, urednik, 2011, str. 63 – 70

Das CGA, Kumar VG, Dhas TS, Karthick V, Govindaraju K, Joselin JM, Baalamurugan J. Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 27, 2020

Espinal-Ruiz M, Parada-Alfonso F, Restrepo-Sanchez LP, Narvaez-Cuenca CE, McClements DJ. Impact of dietary fibers [methyl cellulose, chitosan, and pectin] on digestion of lipids under simulated gastrointestinal conditions, *Food & Function* 5, 2014, 3083 – 3095

Fordyce FM. Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. U: *Essentials of Medical Geology*. Springer, Dordrecht, Selinus O, urednik, 2013, str. 375 – 416

Garcia-Vaquero M, Rajauria G, Tiwari B. Conventional extraction techniques: Solvent extraction. *Sustainable Seaweed Technologies: Cultivation, Biorefinery, and Applications*, 2020, 178 – 181

Hileuskaya K, Ladutska A, Kulikouskaya V, Kraskouski A, Novik G, Kozerozhets I, Kozlovskiy A, Agabekov V. ‘Green’ approach for obtaining stable pectin-capped silver nanoparticles: physico-chemical characterization and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 585, 2020

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

Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2003, 1811 – 1815

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1999, 3954 – 3962

Khotimchenko M. Pectin polymers for colon-targeted antitumor drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 158, 2020, 1110 – 1124

Kumar A, Dixit CK. Methods for characterization of nanoparticles. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, 2017, 43 – 58

Liu LS, Fishman ML, Hicks KB, Kende M. Interaction of various pectin formulations with porcine colonic tissues, *Biomaterials* 26, 2005, 5907 – 5916

Lu Z, Wang J, Gao R, Ye F, Zhao G. Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology* 86, 2019, 172 – 187

Martelli Tosi M, Ramos AP, Esposto BS, Jafari SM. Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients, *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients*, 2020, 190 – 201

Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* 2013, 18, 3292 – 3311

Menon S, Agarwal H, Kumar SV, Rajeshkumar S. Biomimetic synthesis of selenium nanoparticles and its biomedical applications. *U: Micro and Nano Technologies*,

Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, Elsevier. Shukla AK, Iravani S, urednici, 2019, str. 165 – 197

Menon S, Agarwal H, Rajeshkumar S, Rosy PJ, Kumar SV. Investigating the Antimicrobial Activities of the Biosynthesized Selenium Nanoparticles and Its Statistical Analysis. *BioNanoScience* 10, 2020, 122 – 135

Nguyen THD, Vardhanabhuti B, Lin M, Mustapha A. Antibacterial properties of selenium nanoparticles and their toxicity to Caco-2 cells. *Food Contron* 77, 2017, 17 – 24

Nussinovitch A. Pectins. U: Hydrocolloid Applications. Springer, Boston, MA, 1997, str. 83 – 104

Nuttall KL. Evaluating selenium poisoning. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 36, no. 4, 2006, 409 – 420

Parveen K, Banse V, Ledwani L. Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages. *AIP Conference Proceedings* 1724, 2016

Prasad KS, Patel H, Patel T, Patel K, Selvaraj K. Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103, 2013, 261 – 266

Popov SV, Ovodov YS. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry Moscow* 78, 2013, 823 – 835

Prasad KS, Selvaraj K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As (III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biological Trace Element Research* 157, 2014, 275 – 283

Qiu WY, Wang YY, Wang M, Yan JK. Construction, stability, and enhanced antioxidant activity of pectin decorated selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 2018, 692 – 700

- Rayman MP. Selenium and human health, *The Lancet* 379, 2012, 1256 – 1268
- Rayman, MP. The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356, 2000, 233 – 241
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1999, 1231 – 1237
- Shahidi F, Zhong Y. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods, 2015, 298, 299
- Shubhika K. Nanotechnology and medicine – The upside and the downside. *International Journal of Drug Development & Research* 5, 2013, 1 – 10
- Sikora A, Bartczak, D, Geißler D, Kestens V, Roebben G, Ramaye Z, Varga Z, Palmi M, Shard AG, Goenaga – Infante H, Minelli C. A systematic comparison of different techniques to determine the zeta potential of silica nanoparticles in biological medium, *Analytical Methods*, 2015
- Skalickova S, Milosavljevic V, Cihalova K, Horky P, Richtera L, Adam V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition* 33, 2017, 83 – 90
- Sonkusre P, Nanduri R, Gupta P, Singh Cameotra S. Improved extraction of intracellular biogenic selenium nanoparticles and their specificity for cancer chemoprevention. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 2014
- Spektrofotometar, <https://repozitorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A402/datastream/PDF/view>, pristupljeno 27.10.2020.
- Ventura M, Melo M, Carrilho F. Selenium and Thyroid Disease: From Pathophysiology to Treatment. *International Journal of Endocrinology*, 2017, 1 – 9

Vityazev FV, Golovchenko VV, Patova OA, Ovodov YS, Drozd NN, Makarov VA, Shashkov AS. Synthesis of sulfated pectins and their anticoagulant activity. *Biochemistry Moscow* 75, 2010, 759 – 768

Voragen AGJ, Coenen GJ, Verhoef RP, Schols HA. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls, *Structural Chemistry* 20, 2009, 263 – 275

Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, 1999, str. 75 – 94

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

Zeta potencijal, <https://repositorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma%3A600/datastream/PDF/view>, pristupljeno 28.10.2020.

7. SAŽETAK

Komina rajčice je otpad koji zaostaje pri preradi rajčice u različite prehrambene proizvode. Budući da sadrži visok postotak korisnih spojeva poput likopena i pektina, predstavlja vrijednu sekundarnu sirovinu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti primjene sirovog i pročišćenog pektina komine rajčice kao inkapsulacijskih sredstava za sintezu čestica nanoselena usporedbom veličine srednjeg promjera, zeta potencijala i antioksidativnog učinka tih čestica s česticama dobivenim korištenjem komercijalno dostupnih pektina ili polivinilpirolidona kao uobičajenog sintetskog inkapsulacijskog sredstva. Rezultati istraživanja pokazuju da su i sirovi i pročišćeni pektini izolirani iz komine rajčice primjenjivi u sintezi nanočestica selena te da su dobivene čestice prema promatranim svojstvima ili usporedive ili bolje od nanočestica selena dobivenih korištenjem komercijalno dostupnog pektina ili polivinilpirolidona. Čestice najmanjeg srednjeg promjera i najvećeg redukcijskog potencijala dobivene su upravo primjenom sirovog pektina ekstrahiranog iz komine rajčice. Potrebna su daljnja istraživanja kojima će se usavršiti protokol za sintezu nanočestica selena s ciljem dobivanja čestica visokog redukcijskog potencijala, a promjera manjeg od 100 nm. Također potrebno je provesti istraživanja stabilnosti i bioraspoloživosti nanoselena dobivenog korištenjem pektina komine rajčice kao inkapsulacijskog sredstva.

SUMMARY

Tomato pomace is a waste that is left behind when processing tomatoes into various food products. Because it contains a high percentage of useful compounds such as lycopene and pectin, it is a valuable secondary raw material in the pharmaceutical and food industries.

The aim of this study was to investigate the possibilities of using raw and purified pectin fractions obtained from tomato pomace as encapsulating agents for the synthesis of nanoselenium. Mean diameter, zeta potential and antioxidant effect of these particles were compared to nanoparticles obtained using commercially available pectin or polyvinylpyrrolidone as common synthetic encapsulation agent. The results of the study show that both crude and purified pectins isolated from tomato pomace are applicable in the synthesis of selenium nanoparticles and that obtained are either comparable or better than selenium nanoparticles obtained using commercially available pectin or polyvinylpyrrolidone (according to the observed properties). Particles that had the smallest medium diameter and the highest reduction potential were obtained by applying crude pectin extracted from tomato pomace. Further research is needed to refine the protocol for the synthesis of selenium nanoparticles with the aim of obtaining particles with a high reduction potential and a diameter of less than 100 nm. It is also necessary to conduct further research on the stability and bioavailability of nanoselenium obtained using tomato pomace pectin as an encapsulating agent.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA I KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA SELENA S OMOTAČEM PEKTINA DOBIVENIH IZ KOMINE RAJČICE

Dora Anić

SAŽETAK

Komina rajčice je otpad koji zaostaje pri preradi rajčice u različite prehrambene proizvode. Budući da sadrži visok postotak korisnih spojeva poput likopena i pektina, predstavlja vrijednu sekundarnu sirovinu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti primjene sirovog i pročišćenog pektina komine rajčice kao inkapsulacijskih sredstava za sintezu čestica nanoselena usporedbom veličine srednjeg promjera, zeta potencijala i antioksidativnog učinka tih čestica s česticama dobivenim korištenjem komercijalno dostupnih pektina ili polivinilpirolidona kao uobičajenog sintetskog inkapsulacijskog sredstva. Rezultati istraživanja pokazuju da su i sirovi i pročišćeni pektini izolirani iz komine rajčice primjenjivi u sintezi nanočestica selena te da su dobivene čestice prema promatranim svojstvima ili usporedive ili bolje od nanočestica selena dobivenih korištenjem komercijalno dostupnog pektina ili polivinilpirolidona. Čestice najmanjeg srednjeg promjera i najvećeg redukcijskog potencijala dobivene su upravo primjenom sirovog pektina ekstrahiranog iz komine rajčice. Potrebna su daljnja istraživanja kojima će se usavršiti protokol za sintezu nanočestica selena s ciljem dobivanja čestica visokog redukcijskog potencijala, a promjera manjeg od 100 nm. Također potrebno je provesti istraživanja stabilnosti i bioraspoloživosti nanoselena dobivenog korištenjem pektina komine rajčice kao inkapsulacijskog sredstva.

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

Rad sadrži: 50 stranica, 31 grafički prikaz, 4 tablice i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: selen, nanočestice, pektini, komina rajčice, stabilnost, antioksidacijski potencijal

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

Ocjenjivači: **Izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. dr. sc. Lovorka Vujić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Prof. dr. sc. Željka Vanić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL AND CHARACTERIZATION OF SELENIUM NANOPARTICLES WITH PECTIN COATING OBTAINED FROM TOMATO POMACE

Dora Anić

SUMMARY

Tomato pomace is a waste that is left behind when processing tomatoes into various food products. Because it contains a high percentage of useful compounds such as lycopene and pectin, it is a valuable secondary raw material in the pharmaceutical and food industries. The aim of this study was to investigate the possibilities of using raw and purified pectin fractions obtained from tomato pomace as encapsulating agents for the synthesis of nanoselenium. Mean diameter, zeta potential and antioxidant effect of these particles were compared to nanoparticles obtained using commercially available pectin or polyvinylpyrrolidone as common synthetic encapsulation agent. The results of the study show that both crude and purified pectins isolated from tomato pomace are applicable in the synthesis of selenium nanoparticles and that obtained are either comparable or better than selenium nanoparticles obtained using commercially available pectin or polyvinylpyrrolidone (according to the observed properties). Particles that had the smallest medium diameter and the highest reduction potential were obtained by applying crude pectin extracted from tomato pomace. Further research is needed to refine the protocol for the synthesis of selenium nanoparticles with the aim of obtaining particles with a high reduction potential and a diameter of less than 100 nm. It is also necessary to conduct further research on the stability and bioavailability of nanoselenium obtained using tomato pomace pectin as an encapsulating agent.

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

Thesis includes: 50 pages, 31 figures, 4 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: selenium, nanoparticles, pectin, tomato pomace, stability, antioxidant potential

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vanić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 2021.