

Inkapsulacija biljnih ekstrakata ionskim geliranjem emulzija

Blažanin, Anamaria

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:551489>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Anamaria Blažanin

6424/N

**INKAPSULACIJA BILJNIH EKSTRAKATA IONSKIM
GELIRANJEM EMULZIJA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija uživala

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za prehrambeno- tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju ugljohidrata i konditorskih proizvoda

INKAPSULACIJA BILJNIH EKSTRAKATA IONSKIM GELIRANJEM EMULZIJA

Anamaria Blažanin, 6424/N

Sažetak: S obzirom na tradicionalnu uporabu u narodnoj medicini i bogat bioaktivni sastav, posebice visoki udio polifenola i hidroksicimetnih kiselina, u ovom radu ispitana je mogućnost inkapsulacije bioaktivnih spojeva ekstrakta maslačka primjenom metode ionskog geliranja emulzija kao tehnike inkapsulacije. Kao nosači za inkapsulaciju korišteni su prirodni biopolimerni materijali i njihove kombinacije - alginat, pektin, proteini sirutke i derivati celuloze. Dobivenim česticama ispitana su morfološka svojstva, veličina čestica, udjel vode, inkapsulacijska učinkovitost te otpuštanje u gastrointestinalnim uvjetima. Dobiveni rezultati pokazali su da se ionsko geliranje u emulzijama može primijeniti kao tehnika mikroinkapsulacije budući da su formirane mikročestice veličine $\leq 800 \mu\text{m}$. Bolji parametri inkapsulacije (veličina čestica, udjel vode, inkapsulacijska učinkovitost, produljenje otpuštanja) postignuti su primjenom alginata kao nosača u odnosu na pektin. Poboljšanju ispitivanih parametara pridonijelo je i pojačanje alginatnog gela s drugim hidrokolidima, kao što su proteini sirutke i hidroksi-propil metilceluloza u odnosu na čiste alginatne čestice. Kao optimalni sustav pokazale su se alginatne čestice s proteinima sirutke budući da su poprimile pravilan, sferičan oblik te omogućile najveću inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola – 77,35% i vrlo dobro zadržavanje hidroksicimetnih kiselina – 89,14%. Primjena kombinacije alginata s hidroksi-propil metilcelulozom kao nosačem omogućila je najbolji profil otpuštanja ovih spojeva iz formiranih mikročestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima (do 130 minuta).

Ključne riječi: alginat, emulzije, ionsko geliranje, maslačak, polifenoli, proteini sirutke

Rad sadrži: 39 stranica, 11 slika, 5 tablica, 54 literaturnih navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Dr. sc. Ana Belščak-Cvitanović, Arijana Bušić, mag. ing.

Rad predan: rujan 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Carbohydrates and Confectionery products

ENCAPSULATION OF HERBAL EXTRACTS BY IONIC GELATION OF EMULSIONS

Anamaria Blažanin, 6424/N

Abstract: Considering its traditional and widespread use in folk medicine and rich bioactive composition, especially a high content of polyphenols and hydroxycinnamic acid, in this study, the possibility of encapsulation of bioactive compounds of dandelion (*Taraxacum officinalis* L.) extract by ionic gelation of emulsions as the encapsulation technique was evaluated. Natural biopolymer materials and their combinations – alginate, pectin, whey proteins and cellulose derivatives were used as the carriers for encapsulation. The morphological characteristics, particle size, water content, encapsulation efficiency and release in gastrointestinal conditions were evaluated. The obtained results revealed that the ionic gelation of emulsions can be used as a microencapsulation technique since micro-sized particles ranging $\leq 800 \mu\text{m}$ were formed. Better encapsulation parameters (particle size, water content, encapsulation efficiency, release kinetics) were achieved using alginate as the carrier material in comparison to pectin. Also, incorporation of other gelling hydrocolloids, such as whey proteins and hydroxy-propyl methylcellulose in the alginate gel resulted with better parameters in relation to the plain alginate particles. The combination of alginate with whey proteins as the carrier matrix was proved to be the optimal delivery system, since it was characterized by regular, spherical shape and exhibited high encapsulation efficiency of total polyphenols – 77,35% and very good retention of hydroxycinnamic acids – 89,14%. Using alginate in combination with hydroxy-propyl methylcellulose as the carrier enabled the best (prolonged) release profile of these compounds from the formed microparticles in simulated gastrointestinal fluids (up to 130 minutes).

Keywords: alginate, emulsions, ionic gelation, dandelion, polyphenols, whey proteins

Thesis contains: 39 pages, 11 figures, 5 tables, 54 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: PhD Ana Belščak-Cvitanović, Arijana Bušić, BSc

Thesis delivered: September, 2015.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Inkapsulacija bioaktivnih sastojaka i njihova primjena	3
2.1.1. Inkapsulacija	3
2.1.2. Morfologija i veličina mikročestica	4
2.1.3. Primjena mikroinkapsulacijskih tehnika	5
2.2. Ionsko geliranje	6
2.2.1. Prirodni polimeri kao nosači za inkapsulaciju.....	7
2.3. Ionsko geliranje emulzija	8
2.4. Bioaktivni spojevi maslačka i njihovi pozitivni zdravstveni učinci	10
2.4.1. Maslačak (<i>Taraxacum officinale</i>)	10
2.4.2. Bioaktivni sastojci maslačka.....	10
2.4.3. Zdravstveni učinci bioaktivnih spojeva maslačka	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijal	13
3.1.1. Priprema polifenolnih ekstrakata	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka	13
3.2.2. Karakterizacija čestica.....	15
3.2.2.1. Morfološke karakteristike formiranih čestica	15
3.2.2.2. Određivanje parametara raspodjele veličine čestica.....	15
3.2.2.3. Određivanje udjela vode (suhe tvari).....	16
3.2.2.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola	17
3.2.2.5. Praćenje otpuštanja polifenola iz čestica u gastrointestinalnim uvjetima.....	17
3.2.2.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica.....	18
3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola	18
3.2.4. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina	19
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	20
4. REZULTATI	22
4.1. Usporedba udjela vode u formuliranim mikročesticama	22
4.2. Parametri raspodjele veličina čestica i izgled čestica	23
4.3. Usporedba inkapsulacijske učinkovitosti različitih sustava nosača.....	25
4.4. Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva iz hidrogel mikročestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u gastrointestinalnim tekućinama.....	26
4.5. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode	27
5. RASPRAVA	28
5.1. Udjel vode u mikročesticama	28
5.2. Raspodjela veličina i izgled alginatnih i pektinskih čestica	28
5.3. Stupanj inkapsulacije	30
5.4. Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva.....	31
5.5. Povećanje mase nakon vezanja vode	32
6. ZAKLJUČCI	33
7. LITERATURA	34

1. UVOD

Uloga hrane u suvremenom načinu života nadilazi svoju osnovnu svrhu prehrane s ciljem osiguravanja potrebnih hranjivih tvari, već se od hrane zahtijeva da ujedno pruža i visok udjel biološki aktivnih sastojaka s pozitivnim učincima na zdravlje. Posljednjih godina, biološki aktivni spojevi imaju sve veću zdravstvenu i terapijsku primjenu, zahvaljujući čemu se omogućava i potiče stvaranje novih dodataka prehrani i funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Interes za biološki aktivne spojeve kontinuirano raste, zahvaljujući interesu javnosti i zahtjevima potrošača, ali je i potpomognut razvojem novih tehnologija i naprednih istraživačkih radova o identifikaciji svojstava i potencijalne primjene tih sastojaka (Đorđević i sur., 2014). No, s obzirom na izrazitu nestabilnost i osjetljivost biološki aktivnih spojeva, posebice pri uvjetima prerade i proizvodnje prehrambenih proizvoda te njihovu često vrlo nisku biodostupnost nakon konzumacije, razvijen je interes za očuvanjem tih poželjnih sastojaka s ciljem poboljšanja njihovih funkcionalnih svojstava i povećanja stabilnosti u različitim uvjetima, što je moguće postići primjenom tehnike inkapsulacije.

Inkapsulacija kao tehnika razvijena je prije oko 30 godina s ciljem uspostavljanja fizikalne barijere između bioaktivnih spojeva i nepovoljnih vanjskih uvjeta (Gibbs i sur., 1999). Od materijala koji se primjenjuju kao nosači za mikroinkapsulaciju, najčešće se koriste alginat i pektin. Međutim, najveći nedostatak mikroinkapsulacije u alginatne i pektinske čestice je veliki promjer formiranih čestica. Naime, prosječni promjer dobivenih alginatnih i pektinskih čestica važan je faktor stabilnosti i inkapsulacijske učinkovitosti. Velike čestice općenito omogućavaju veću zaštitu u odnosu na male mikročestice, ali imaju slabu disperziju u konačnom prehrambenom proizvodu, dok čestice malog promjera imaju nisku inkapsulacijsku učinkovitost (Zhao i sur., 2008). Jedan od načina smanjenja veličine i proizvodnje manjih čestica je mikroinkapsulacija u emulzijama, koja podrazumijeva kombinaciju određenog aktivnog sastojka i sredstva za inkapsulaciju kao što je alginat s uljem, pri čemu se unakrsno povezivanje odvija putem unutarnjeg geliranja (Capela i sur., 2007; Poncelet i sur., 1992). Do sada je ovaj pristup korišten za inkapsulaciju probiotika (González i sur., 2013), bakterija mliječne kiseline (Totosaus i sur., 2013), proteina (Ribeiro i sur., 2005), stanica (Larisch i sur., 1994), DNA (Quong i sur., 1998) i drugih lijekova (Ribeiro i sur., 1999). Prednost inkapsulacije u emulzijama je omogućavanje zadržavanja ulja unutar hidrogel čestica sastavljenih od biopolimernih materijala, što je zabilježeno u istraživanjima Sunga i suradnika (2015) te Liua i suradnika (2003), a omogućuje inkapsulaciju i hidrofilnih i lipofilnih aktivnih sastojaka.

U svrhu inkapsulacije ionskim geliranjem emulzija, koriste se različiti materijali poput karagenana, alginata, kitozana i želatine (Krasaekoopt i sur., 2003; Chen i sur., 2007), dok upotreba pektina u ovom postupku nije prethodno zabilježena. Korištenje proteina kao nosača za postupak inkapsulacije bioaktivnih, posebice polifenolnih spojeva ima prednost zbog potencijalnih protein – polisaharid i protein – polifenol interakcija, koje se mogu pojaviti i time poboljšati inkapsulacijsku učinkovitost polifenolnih sastojaka.

Cilj ovog rada stoga je inkapsulacija polifenolnih spojeva ekstrakta maslačka, kao izvora bioaktivnih sastojaka, metodom ionskog geliranja emulzija, primjenom različitih kombinacija sustava nosača. U tu svrhu formulirati će se čestice na bazi alginata i pektina te njihovih kombinacija s proteinima sirutke i derivatima celuloze. Kako bi se provela karakterizacija čestica odrediti će se morfološke karakteristike, raspodjela veličine mikročestica i udjel vode, dok će se bioaktivni sastav pratiti određivanjem inkapsulacijske učinkovitosti i kinetike otpuštanja ukupnih polifenola, hidrokscimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta formuliranih mikročestica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Inkapsulacija bioaktivnih sastojaka i njihova primjena

2.1.1. Inkapsulacija

Inkapsulacija je tehnika kojom se neki aktivni sastojak „pakira“ u drugi inertni sastojak, odnosno, to je proces obavljanja aktivne komponente s ciljem očuvanja njezinih funkcionalnih svojstava. Povećani interes za inkapsuliranim bioaktivnim sastojcima temelji se i na mogućnosti izmjene fizikalnih svojstava tih sastojaka, npr. reoloških svojstava te prevladavanju nekompatibilnosti i topljivosti između sastojaka, npr. bioaktivnih spojeva i matrica hrane u koju se mikroinkapsulirani sastojci implementiraju.

S tehnološkog gledišta, učinkoviti sustav za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva prikladnih za implementaciju u prehrambeni proizvod mora biti u skladu sa sljedećim zahtjevima:

- mora biti formiran od materijala dozvoljenih za proizvodnju prehrambenih proizvoda, posebno prirodnih sastojaka i koristeći postupke proizvodnje bez primjene organskih otapala
- mora učinkovito imobilizirati bioaktivne spojeve, imati minimalan utjecaj na njihova fizikalno-kemijska i senzorska svojstva te osigurati njihovu stabilnost
- treba omogućiti zaštitu inkapsuliranih spojeva od interakcije s drugim sastojcima hrane te od razgradnje zbog utjecaja temperature, svjetlosti ili pH
- treba povećati bioraspoloživost inkapsuliranih spojeva nakon konzumacije i osigurati njihovo kontrolirano oslobađanje.
- treba biti lako primjenjiv za industrijsku proizvodnju.

Među brojnim inkapsulacijskim tehnikama, neke su već uspostavljene i korištene za industrijske potrebe, kao što je sušenje raspršivanjem dok je primjena nekih drugih tehnika, npr. inkapsulacija temeljena na taloženju sa superkritičnim fluidima tek nedavno razvijena (Đorđević i sur., 2014) (Slika 1).



Slika 1. Prikaz različitih metoda mikroinkapsulacije (Jyothi Sri i sur., 2012)

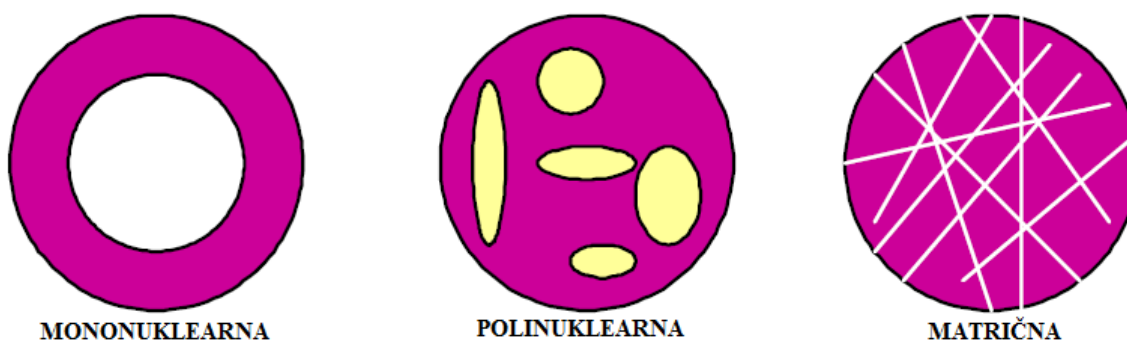
2.1.2. Morfologija i veličina mikročestica

Čestice dobivene mikroinkapsulacijom nazivaju se mikročestice, mikrokapsule ili mikrosfere koje se razlikuju u morfologiji i unutarnjoj strukturi (Jyothi i sur., 2008). Dobivene mikročestice se sastoje od jezgre koju čini kruta tvar, tekućina ili kapljica disperzije te omotača od polimernog materijala. Materijal omotača:

- je inertna tvar koja prekriva jezgru željenom debljinom
- je kompatibilan s materijalom jezgre
- mora postići određenu stabilizaciju materijala jezgre
- je inertan prema aktivnim sastojcima
- mora imati kontrolirano oslobađanje pod određenim uvjetima
- može biti fleksibilan, krhak, tvrd, tanak, itd.

Morfologija čestica dobivenih inkapsulacijom uglavnom ovisi o materijalu jezgre i omotača (Slika 2), te se s obzirom na morfološka svojstva čestice dijele na:

- 1) MONONUKLEARNE (jezgra-omotač) mikročestice - sadrže omotač oko jezgre
- 2) POLINUKLEARNE čestice - imaju mnogo jezgri koje se nalaze unutar omotača
- 3) MATRIČNE čestice - tvar jezgre homogeno raspoređena u materijalu omotača (Jyothi Sri i sur., 2012).



Slika 2. Različite vrste mikročestica (Dubey i sur., 2009)

S obzirom na veličinu, čestice dobivene inkapsulacijom dijele se na:

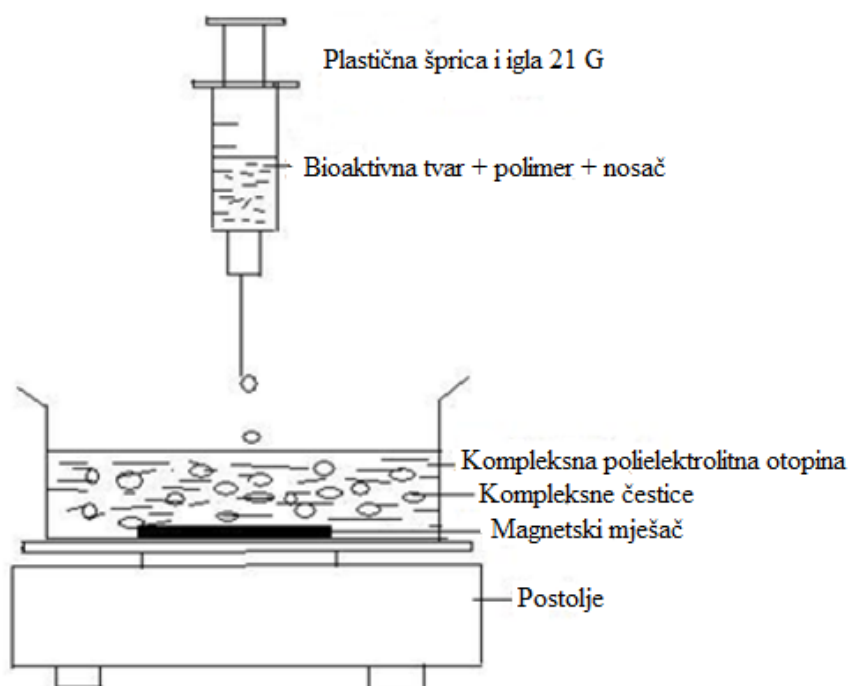
- nanočestice, nanokapsule ili nanosfere čija je veličina od 10 do 1000 nm
- mikročestice, mikrokapsule ili mikrosfere veličine od 2 do 2000 μm
- makročestice veličine $\geq 2000 \mu\text{m}$ (Singh i sur., 2010, Mohanraj i sur., 2006).

2.1.3. Primjena mikroinkapsulacijskih tehnika

Dugi niz godina mikroinkapsulacija se primjenjuje u farmaceutskoj industriji za poboljšanje stabilnosti proizvoda i maskiranje okusa, zbog čega se najčešće inkapsuliraju lijekovi, vitamini i minerali. No, osim u farmaceutskoj industriji, mikroinkapsulacija je korisna i u mnogim drugim industrijama, posebice prehrambenoj. Inkapsulacija se kao tehnika sporo razvijala zbog svoje specifičnosti i relativno visokih ekonomskih troškova (Gibbs i sur., 1999). Posljednjih godina, prehrambena industrija zahtjeva dodatak funkcionalnih sastojaka u proizvode, koji su obično vrlo osjetljivi na vanjske utjecaje, obradu i/ili gastrointestinalne uvjete te se stoga inkapsulacija nametnula kao učinkoviti pristup za zaštitu istih. Različiti funkcionalni sastojci koriste se za kontroliranje okusa, boje, teksture i očuvanje svojstava (El-Abbassi i sur., 2015). U mikroinkapsuliranom obliku ti sastojci mogu spriječiti reakciju s drugim komponentama hrane kao što su kisik i voda čime se spriječava i oksidacija osjetljivih vitamina, minerala i proteina u raznim proizvodima. Još jedna od prednosti uporabe inkapsuliranih sastojaka je i manji gubitak i degradacija hlapivih tvari poput tvari arome. Osim gore navedenog, inkapsulacija se koristi i za imobilizaciju stanica ili enzima u proizvodnim procesima, kao što su procesi fermentacije i proizvodnja metabolita (Nedović i sur., 2011).

2.2. Ionsko geliranje

Jedna od metoda za formiranje mikročestica koja se temelji na primjeni polisaharida kao nosača za inkapsulaciju je metoda ionskog geliranja. Ionsko geliranje je prva tehnika mikroinkapsulacije, razvijena 1950. godine (Srivastava i sur., 2013). U postupku ionskog geliranja polisaharidi (alginat, gelan i pektin) se otapaju u vodi ili u slabo kiselom mediju, pri čemu se otopina polisaharida zatim ukapava uz konstantno miješanje u otopinu koja sadrži ione, najčešće katione suprotnog naboja. Zahvaljujući kompleksu između suprotno nabijenih vrsta, polisaharidi formiraju gel strukturu i talože se u obliku gel kuglica (Slika 3). Gel kuglice se izdvajaju filtracijom, ispiru sa destiliranom vodom i suše.



Slika 3. Formiranje hidrogel kuglica metodom ionskog geliranja (Patil i sur., 2012).

Metoda ionskog geliranja je jednostavna i blaga metoda. U konačnici, reverzibilno fizikalnim unakrsnim povezivanjem elektrostatskim interakcijama umjesto kemijskog povezivanja izbjegava se moguća toksičnost reagensa i druge neželjene posljedice (Racovića i sur., 2009). Čimbenici o kojima ovisi učinkovitost metode ionskog geliranja te oblik i veličina nastalih čestica su:

- koncentracija polimera i kationa za geliranje
- temperatura

- pH otopine za geliranje
- koncentracija bioaktivnog sastojka

2.2.1. Prirodni polimeri kao nosači za inkapsulaciju

Pri inkapsulaciji tehnikom ionskog geliranja sve je veći interes za primjenom prirodnih polimera kao nosača, zbog njihove biokompatibilnosti i biorazgradivosti. Prirodni i polusintetski polimeri odnosno alginat, gelan guma, kitozan, pektin i karboksimetil celuloza imaju široku primjenu u postupku mikroinkapsulacije bioaktivnih sastojaka (Tablica 1). Ti prirodni polielektroliti sadrže određene anione/katione u svojoj kemijskoj strukturi koji tvore unakrsne veze sa suprotno nabijenim ionima i na taj način pokreću proces geliranja.

Alginat je prirodni polimer ekstrahiran iz smeđih morskih algi (Reis i sur., 2006) koji je zbog svoje zastupljenosti u prirodi, biokompatibilnosti i niske cijene najčešće korišten u prehrambenoj industriji kao zgušnjivač i sredstvo za emulgiranje (Kuo i sur., 2001). Također, alginat je hemokompatibilan, ne nakuplja se u većim organima u tijelu. Sadrži dvije uronske kiseline, α -L-guluronsku kiselinu i β -D-manuronsku kiselinu, koje su povezane α -glikozidnom vezom (Racovića i sur., 2009). Najvažnija značajka alginata je njihova sposobnost stvaranja gela u prisutnosti divalentnih i polivalentnih iona od kojih je najznačajniji kalcijev ion. Ti ioni stvaraju mostove između molekula alginata i na taj način grade trodimenzionalnu mrežu (Lelas, 2008). Formiranje alginatnih čestica ovisi o brojnim čimbenicima kao što su naboj i veličina iona, pri čemu su alginatne mikročestice (kalcijev alginat) u prisutnosti jednovalentnih iona, fosfata i citrata te niskih pH uvjeta podložne kemijskoj razgradnji (Khosravi Zanjani i sur., 2014).

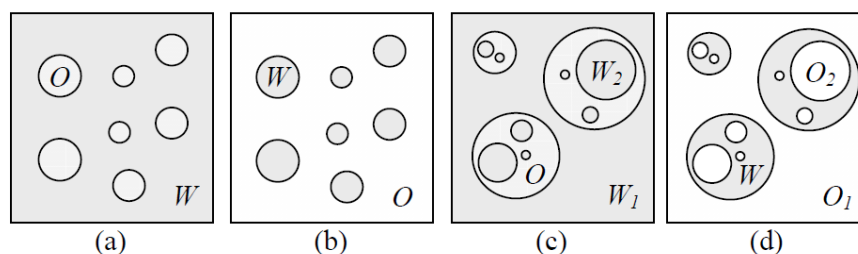
Pektin je prirodni, jeftini, netoksični polisaharid dobiven ekstrakcijom iz kore citrusa ili mesnatog dijela jabuke, a koristi se kao sredstvo za zgušnjavanje i geliranje. U osnovi, to je makromolekula sastavljena od jedinica D-galakturonske kiseline povezanih α -1,4 glikozidnom vezom.

Tablica 1. Polimeri korišteni za metodu ionskog geliranja (Patil i sur., 2012)

Prirodni polimeri	Sintetski monomeri/polimeri	Polivalentni kationi
Kitozan	Hidroksietilmetakrilat [HEMA]	Kalcij (Ca^{2+})
Alginat	N-(2-hidroksipropil) metakrilat [HPMA]	Kalij (K^+)
Fibrin	N-vinil-2-pirolidon [NVP]	Željezo (Fe^{2+}), barij (Ba^{2+}), natrij (Na^{2+}), magnezij (Mg^{2+})
Kolagen	N-izopropilkrilamid [NIPAMM]	Aluminij (Al^{3+})
Želatina	Vinil acetat [VAc]	Cink (Zn^{2+})
Hijaluronska kiselina	Akrilna kiselina [AA]	
Dekstran	Metakrilna kiselina [MAA]	
	Polietilen glikol akrilat/metakrilat [PEGA/PEGMA]	
	Polietilen glikol diakrilat/dimetakrilat [PEGDA/PEGDMA]	

2.3. Ionsko geliranje emulzija

S obzirom na mehanizam disperzije uljne i vodene faze u sustavu, razlikuje se nekoliko vrsta emulzija. Jednostavne emulzije su definirane kao sustavi ulje-u-vodi (O/W) gdje su uljne kapljice raspršene u vodi ili voda-u-ulju (W/O) kad su vodene kapljice raspršene u ulju. S druge strane dvostruke ili višestruke emulzije predstavljaju sustave $W_1/O/W_2$ ili $O_1/W/O_2$ gdje W_1 (odnosno O_1) i W_2 (odnosno O_2) pokazuju vanjsku i unutarnju fazu (Slika 4).



Slika 4. Vrste emulzija: (a) Jednostavna ulje-u-vodi O/W, (b) Jednostavna voda-u-ulju W/O, (c) Dvostruke ili višestruke $W_1/O/W_2$, (d) Dvostruke ili višestruke $O_1/W/O_2$

Emulzije tipa ulje-u-vodi (O/W) su sustavi koji su uobičajeno korišteni u industriji hrane i pića, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji za pripremu raznih proizvoda. Također se mogu koristiti kao otopine za geliranje u postupku mikroinkapsulacije hidrofobnih aktivnih tvari koje se mogu dodati uljnoj fazi prije formiranja O/W emulzija, hidrofilnih sastojaka koji mogu biti inkapsulirani u vodenoj fazi te posebice lipofilnih spojeva gdje polimerni omotač sprječava oksidaciju lipida i osigurava oslobađanje aktivnih sastojaka na odgovarajućem mjestu. U prijašnjim znanstvenim istraživanjima, polisaharidi su korišteni za stabilizaciju O/W emulzija koje sadrže visoki udio ulja. Jedno od istraživanja uključivalo je stabilizaciju O/W emulzija koje sadrže 50% (v/v) ulja s ksantan gumom i Tween 80 (Krstonošić i sur., 2009). U drugom radu provedena je stabilizacija O/W emulzija koje sadrže 70% (v/v) ulja sa skleroglukanom, dimetikol kopoliolom i tetradeciltrimetilamonijevim bromidom. Međutim, s obzirom da navedeni polisaharidi nemaju sposobnost geliranja, nedavno je započeto korištenje alginata i želatine za geliranje emulzija. Negativna strana emulzija stabiliziranih alginatom je formiranje velikih kapljica ulja ($>100 \mu\text{m}$). S ciljem razvijanja emulzija željenih karakteristika kao što su mala veličina kapljica ulja i povećana stabilnost, najnovija istraživanja koriste neionske surfaktante (tvari koje smanjuju površinsku napetost vode), kao što su Tween 80 i Span 20 za stabilizaciju alginat-O/W emulzija s visokim udjelom ulja – 30% (v/v) (Ong i sur., 2014).

Mikroinkapsulacija u emulzijama uključuje kombinaciju smjese aktivnog sastojka i nosača za inkapsulaciju kao što je natrijev alginat s biljnim uljem, pri čemu se alginatne čestice formiraju polaganim dodavanjem kalcijevih iona u emulziju uz miješanje. U slučaju alginata dodaje se octena kiselina, u ulju topiva kiselina koja omogućava oslobađanje kalcijevih iona uslijed pada pH i oni započinju umrežavanje alginata. Alginat je jedan od najpoželjnijih materijala za inkapsulaciju zbog netoksičnosti, biokompatibilnosti i niske cijene (Totosaus i sur., 2013). Osim alginata kao sredstva za geliranje mogu se koristiti i κ -karagenan, kitozan, želatina i pektin (Đorđević i sur., 2014). Upotreba različitih gelirajućih hidrokoloida za mikroinkapsulaciju će utjecati na održivost inkapsuliranog aktivnog sastojka. Konačni produkt emulgiranja su male mikročestice veličine (10 μm do 1 mm).

Mikrokapsule dobivene ionskim geliranjem u ulju najčešće su sferične, multinuklearne i sa definiranim omotačem. Sastav i koncentracija polimernog omotača i okolišni uvjeti kao što je pH izravno su povezani s učinkovitosti formiranja mikročestica.

Tablica 2. Pregled postupaka mikroinkapsulacije u emulzijama različitih bioaktivnih sastojaka

Nosač/materijal	Ulje	Vrsta emulzije	Inkapsulirani sastojak	Referenca
Želatina	Sojino ulje	W/O/W	L-askorbinska kiselina	Khalid i sur., 2014
Nije specificirano	Repičino ulje	W/O/W	Betalain	Kaimainen i sur., 2015
Proteini sirutke	Ulje algi	O/W	Omega-3 masne kiseline	Chee i sur., 2005
Kitozan/ maltodekstrin/ proteini sirutke	Ulje tune	O/W	Omega-3 masne kiseline	Klaypradit i sur., 2008

2.4. Bioaktivni spojevi maslačka i njihovi pozitivni zdravstveni učinci

2.4.1. Maslačak (*Taraxacum officinale*)

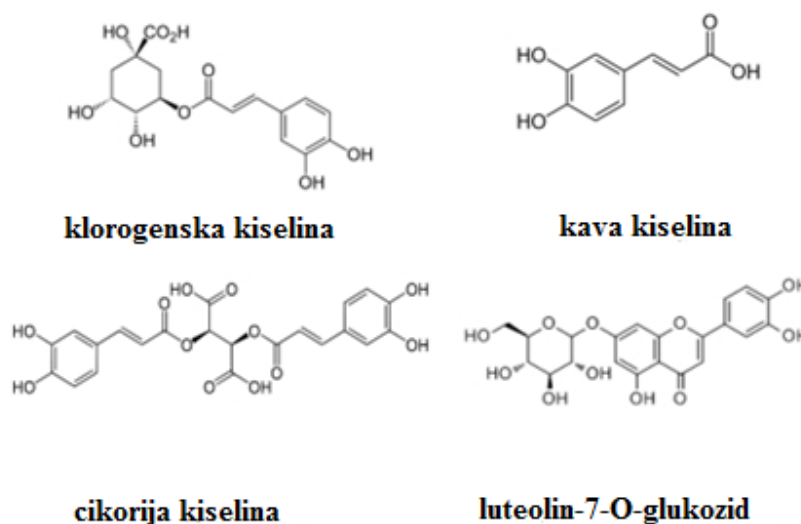
Maslačak, *Taraxacum officinale* L., je trajna višegodišnja biljka iz porodice *Asteraceae*. Cijela biljka je jestiva i ljekovita pa se zbog toga često sakuplja s prirodnih staništa. Brojne vrste maslačka rastu u područjima Europe, Azije i Sjeverne Amerike (Erhatic i sur., 2014). Maslačak je biljka čiji podzemni dio čini korijen, dok nadzemni dio čini rozeta listova iz čijeg se središnjeg dijela u vrijeme cvatnje, razvija cjevasta cvjetna stabljika s cvjetnom glavicom na vrhu. Oblik, veličina i sastav cvjetnih glavica može u znatnoj mjeri varirati (Gelenčir i sur., 1991).

Cvjetovi maslačka danas služe kao sirovina za proizvodnju ekstrakata koji se koriste u prehrambenoj industriji za poboljšanje okusa mliječnim proizvodima, slasticama, pekarskim proizvodima, ali i u kozmetičkoj industriji.

2.4.2. Bioaktivni sastojci maslačka

Polifenolni spojevi dominantni su bioaktivni spojevi maslačka. Udio polifenolnih spojeva veći je u cvjetovima i listovima, odnosno vanjskim dijelovima biljke ($9,9 \pm 0,28$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka) nego u korijenu ($0,086 \pm 0,003$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka). Glavni polifenolni spojevi cvjetova maslačka (Slika 5) su

hidroksicimetne kiseline i njezini derivati, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina i cikorinska kiselina, od kojih je cikorinska kiselina prisutna u najvećoj koncentraciji. Osim hidroksicimetnih kiselina u maslačku su identificirani i luteolin te luteolin-7-O-glukozid. Polifenoli maslačka pokazali su značajno antioksidacijsko, antikancerogeno, antimikrobno, antivirusno, protuupalno i hepatoprotektivno djelovanje u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima (González-Castejón i sur., 2012).



Slika 5. Struktura glavnih polifenola cvjetova maslačka (Chen i sur., 2012).

2.4.3. Zdravstveni učinci bioaktivnih spojeva maslačka

Veliki broj znanstvenih istraživanja pokazao je da dva glavna sastojka cvijeta maslačka, cikorinska kiselina i luteolin imaju sposobnost smanjenja visoke koncentracije radikala dušikovog oksida (NO) u stanicama, protuupalnih citokina, faktora nekroze tumora (TNF)- α , interleukina (IL)-1 β te sposobnost suzbijanja oksidativnog stresa (Park i sur., 2011). Luteolin i luteolin-O-glukozid sprječavaju ekspresiju proteina iNOS i COX-2, dva kritična enzima odgovorna za proizvodnju dušikovog oksida i PGE2 (Hu i sur., 2004). Cikorinska kiselina je moćan inhibitor enzima integraze. Integraza je uključena u proces ulaska HIV-a (virus humane imunodeficijencije tip I) u genom ljudskih stanica. Cikorinska kiselina inhibira navedeni enzim u koncentraciji od 1-4 $\mu\text{g/mL}$. Međutim, *in vitro* istraživanja pokazala su da s vremenom HIV integraza postaje otporna na cikorinsku kiselinu. Aktivnost enzimski oksidiranih derivata klorogenske kiseline protiv herpes virusa tipa I i II otkrivena je

u brojnim istraživanjima. Ekstrakti koji sadrže određene koncentracije klorogenske kiseline inhibiraju HIV reverzibilnu transkriptazu. Klorogenska kiselina djeluje protiv patogenih bakterija *Staphylococcus* i *Escherichia coli*. Utvrđeno je i da klorogenska kiselina inhibira biosintezu leukotriena blokiranjem 5- i 12-lipooksigenaze čime se kontrolira astma, upale i alergije. Nedavna istraživanja pokazuju da klorogenska kiselina i njezini analozi sprječavaju sintezu glukoze tijekom glukoneogeneze i glikogenolize putem kompetitivnog reverzibilnog inhibitora glukoze-6-fosfataze, što rezultira sniženjem razine glukoze u krvi (Chkhikvishvili i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

U ovom radu korišteni su cvjetovi maslačka (*Taraxacum officinale* L.) podrijetlom iz Hrvatske (2015. godina). Cvjetovi maslačka su nakon ubiranja sušeni na sobnoj temperaturi te za potrebe pripreme ekstrakata i eksperimentalnih ispitivanja usitnjeni u tarioniku do praškastog stanja.

3.1.1. Priprema polifenolnih ekstrakata

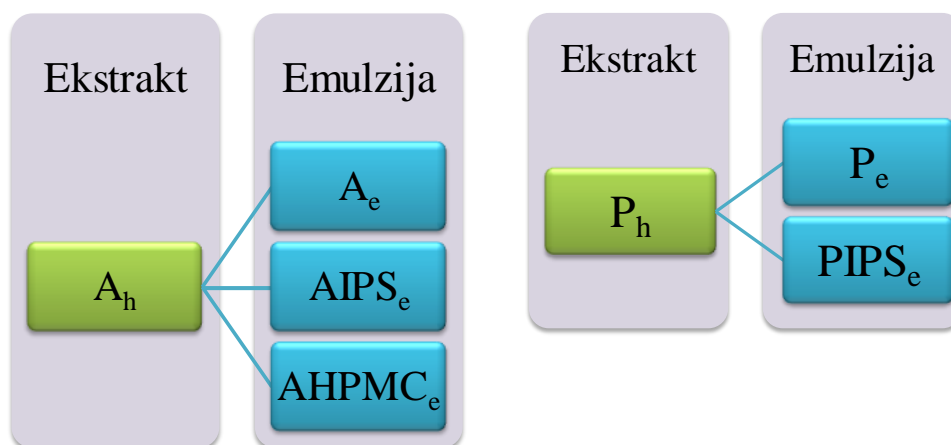
Ekstrakt maslačka pripremljen je prelijevanjem 10 g usitnjenog uzorka s 200 mL destilirane vode temperature 80°C. Ekstrakcija je provedena zagrijavanjem pri konstantnoj temperaturi od 80°C uz povremeno miješanje staklenim štapićem tijekom 15 minuta. Nakon toga uzorak je procijeđen kroz metalnu cjediljku s dva sloja pamučne gaze, nadopunjen do poznatog volumena (200 mL) te ohlađen na sobnu temperaturu.

U svakom pripremljenom ekstraktu određen je udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina, antioksidacijski kapacitet te udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom HPLC analize.

3.2. Metode

3.2.1. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka

Kao materijali za formuliranje različitih sustava nosača korišteni su prirodni biopolimeri: alginat niske viskoznosti (A), nisko-esterificirani pektin (P), izolat proteina sirutke (IPS) i hidroksi-propil metilceluloza (HPMC). Iz navedenih polimera pripremljeno je 7 različitih sustava, kombinacijom alginata i pektina s proteinima sirutke i celulozom, te ovisno o uvjetima inkapsulacije (u hidrofilnom mediju (h) ili ulju-emulziji (e)), kao što je prikazano na shematskom prikazu na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz formuliranih mikročestica alginatnih (Ah), pektinskih (Ph), alginatnih dobivenih u emulzijama (Ae), pektinskih dobivenih u emulzijama (Pe), alginatnih s proteinima sirutke (AIPSe), pektinskih s proteinima sirutke (PIPSe) te alginatnih s hidroksi-propil metilcelulozom (AHPMCE)

Otopine svih nosača pripremljene su otapanjem praha alginata, proteina sirutke, celuloze ili pektina u prethodno pripremljenom ekstraktu maslačka, u odgovarajućem masenom odnosu, tako da je dobiveno 50 mL otopina konačnih koncentracija 2% (w/v). Tako pripremljenim otopinama dodana je određena količina kalcijevog karbonata (CaCO_3), a zatim su otopine sustava nosača homogenizirane na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi tijekom 24 h, nakon čega su korištene u eksperimentima.

Prilikom inkapsulacije ionskim geliranjem u hidrofilnim uvjetima, otopine za geliranje pripremljene su otapanjem 2% kalcijevog klorida u ekstraktu maslačka. Za potrebe inkapsulacije u emulzijama, korišteno je suncokretovo ulje s dodatkom 0,5% emulgatora.

Formiranje čestica provedeno je ukapavanjem otopina i sustava nosača (5 mL) pomoću plastične šprice i igle od 20 G (unutrašnji promjer ~ 300-500 μm) u prethodno pripremljene otopine za geliranje. Za postupak inkapsulacije u emulzijama, nakon ukapavanja sustava nosača u ulje te homogenizacije do postizanja željene veličine čestica, emulziji je dodana određena količina octene kiseline kako bi se omogućilo formiranje čestica. Prilikom oba postupka inkapsulacije ukapavanjem mješavine su miješane magnetskom miješalicom, pri čemu je dolazilo do očvršćivanja kapi u čestice sfernog oblika. Nakon formiranja čestica, čestice su ostavljene u otopini za geliranje ili emulziji cca. 30 min, nakon čega su formirane

čestice izdvojene iz otopine kalcijevog klorida filtriranjem i ispiranjem u ekstraktu maslačka, a iz ulja ispiranjem etanolom.

3.2.2. Karakterizacija čestica

3.2.2.1. Morfološke karakteristike formiranih čestica

U cilju određivanja oblika i strukture alginatnih i pektinskih čestica provedeno je snimanje hidrogel čestica optičkim mikroskopom uz odgovarajuće povećanje (1x - 40x).

3.2.2.2. Određivanje parametara raspodjele veličine čestica

Raspodjela veličine čestica dobivenih inkapsulacijom ionskim geliranjem u hidrofilnim i lipofilnim uvjetima (emulzijama) analizirana je primjenom laserske difrakcije, korištenjem laserskog analizatora veličine čestica Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Velika Britanija).

Analiza veličine čestica temelji se na činjenici da čestice prilikom prolaska kroz izvor svjetlosti (lasersku zraku) raspršuju svjetlost pod određenim kutovima koji izravno ovise o veličini čestica. Laserska zraka ulazi u radnu ćeliju pod kutem od $0,02^\circ$ do 140° te omogućuje određivanje veličine čestica u rasponu od 0,2 do 2000 μm .

Uređaj za lasersku difrakciju opremljen je jedinicom za tekuću disperziju Hydro 2000S, te je uzorak prilikom mjerenja dodan u vodeni medij u kojem je provedeno ultrazvučna disperzija za ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Zasićenje laserske zrake je podešeno na 2-6%, a za svaki uzorak provedena su tri paralelna mjerenja. Rezultati su izraženi kao parametri raspodjele veličine čestica, kako je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Parametri raspodjele veličine čestica

Parametar	Definicija
d (0,1)	Promjer čestica od kojeg je manje 10% čestica cijelog uzorka
d (0,5)	Promjer čestica za koji vrijedi da 50% ukupnog broja čestica ima promjer manji od tog promjera
d (0,9)	Promjer čestica od kojeg je manje 90% čestica cijelog uzorka
D [3,2]	Sauterov promjer; srednji površinski promjer čestica
PSD raspon	Homogenost raspodjele veličine čestica ($PSD = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)}$)

3.2.2.3. *Određivanje udjela vode (suhe tvari)*

Princip metode:

Udio suhe tvari određen je prema modificiranoj AOAC 930.15 metodi (1990). Ovim postupkom mjeri se masa suhe tvari nakon sušenja do konstantne mase budući da na temperaturi sušenja od 105°C dolazi do izdvajanja slobodne vlage iz uzorka. Udio suhe tvari izračunava se u odnosu na početnu masu uzorka koji se suši.

Postupak rada:

U prethodno osušene (do konstantne mase pri 105°C), ohlađene i izvagane aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom i poklopcem odvaži se 1 g (s točnošću ± 0,0001) formiranih čestica. Posudica s uzorkom i poklopac suše se 2-3 h u sušioniku pri 105°C (period sušenja počinje kada je u sušnici postignuta temperatura točno 105°C). Nakon isteka vremena sušenja, aluminijska posudica s uzorkom pokrije se poklopcem dok je još u sušioniku, prebaci u eksikator i važe čim se ohladi na sobnu temperaturu. Postupak se ponavlja dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici (s točnošću ± 0,0003 g). Ostatak uzorka predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi predstavlja udio vode u uzorku.

Izračun rezultata:

Udio vode izračuna se prema formuli (2), dok se udjel suhe tvari izračuna kao razlika udjela vode od 100% (3).

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (2)$$

gdje su: m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)
 m_2 – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)
 m_3 – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

$$\text{Udjel suhe tvari (\%)} = 100 - \text{udjel vode (\%)} \quad (3)$$

3.2.2.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola

Udjel polifenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina imobiliziran u alginatnim i pektinskim česticama, kombiniranim s različitim nosačima, određen je otapanjem poznate količine profiltriranih čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), uz snažno miješanje na Vortex mikseru.

Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteu reagensa, dok je udjel hidroksicimetnih kiselina određen s Arnou-om reagensom, kako je opisano u poglavlju 3.2.3. Također, tako dobivene otopine razbijenih čestica korištene su i za HPLC analizu pojedinačnih polifenolnih spojeva, kako bi se omogućila usporedba specifičnih polifenolnih spojeva u svakom ekstraktu prije i nakon inkapsulacije. Postotak imobiliziranih polifenola izračunat je kao omjer između udjela ukupnih polifenola ili hidroksicimetnih kiselina u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih sastojaka u početnim otopinama sustava nosača u ekstraktu maslačka korištenima za inkapsulaciju.

3.2.2.5. Praćenje otpuštanja polifenola iz čestica u gastrointestinalnim uvjetima

Otpuštanje polifenolnih spojeva iz dobivenih čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) uvjetima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom, udjela hidroksicimetnih kiselina te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom. Simulirane gastrična i intestinalna modelna otopina pripremljene su prema protokolu europske farmakopeje (European Pharmacopeia 7.0, 2010) i sastavljene su od natrijevog klorida, klorovodične kiseline i enzima pepsina – *SGF* (pH=1,2) te fosfatnog pufera pH= 7,4 – *SIF*. Formulirane čestice izdvoje se iz otopine za geliranje te se približno 0,5 g profiltriranih čestica suspendira u 30 mL *SGF*-a. Čestice u *SGF*-u konstatno su miješane na magnetskoj mješalici (podešenoj na 100 rpm), na temperaturi od 37°C. U određenim vremenskim razmacima iz otopine se izuzima 2 mL tekućeg medija do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 h. Čestice se zatim uklone iz otopine *SGF*-a filtriranjem i prenesu u 30 mL *SIF*-a te konstantno miješaju na magnetskoj mješalici. Ponovi se postupak uzorkovanja alikvota tekućeg medija u određenim vremenskim razmacima. U ovako dobivenim alikvotima od 2 mL određuje se udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina, karotenoida i antioksidacijski kapacitet, a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne ili kafeinske kiseline/g čestica ili mmol Trolox/g čestica. Pomoću dobivenih rezultata određuje se kinetika otpuštanja polifenola iz ispitivanih sustava nosača.

3.2.2.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica

Omjer povećanja mase nastale usred vezanja vode (bubrenja) u liofiliziranim česticama praćen je provođenjem *Swelling* metode. Alginatne i pektinske mikročestice osušene liofilizacijom (0,01 g) stavljene su u 15 mL destilirane vode te miješane na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. Mjerena je masa mikročestica u određenim intervalima (30 minuta, 1, 2, 4 i 24 sata), a mikročestice su vagane na analitičkoj vagi nakon što su uklonjene iz tekućeg medija, profiltrirane pomoću lijevka i filter papira i posušene staničevinom.

Rezultati su prikazani kao omjer početne mase mikročestica i mase mikročestica nakon vezanja vode u određenom vremenskom periodu.

3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se pri 765 nm (Ough i Amerine, 1988).

Reagensi:

- 1) Folin-Ciocalteu reagens (razrijeđen vodom u omjeru 1:2), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Aparatura i pribor:

- 1) Epruvete
- 2) Mikropipeta volumena 100-1000 μL
- 3) Pipeta volumena 10 mL
- 4) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) Spektrofotometar Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

U staklenu epruvetu otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μ L uzorka, 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3). Sadržaj epruvete dobro se homogenizira i ostavi stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm. Svaki uzorak pripremljen je u dvije paralelne probe ($n=2$), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost dobivenih rezultata. Uz uzorke priprema se i slijepa proba koja umjesto uzorka sadrži 100 μ L destilirane vode. Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g čestica.

$$y = 0,0010x - 0,0001$$

$$R^2 = 1,000$$

gdje su:

x – koncentracija otopine galne kiseline (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

3.2.4. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

Princip metode:

Metoda je preuzeta iz Poljske farmakopeje (2005), a korištena je za određivanje hidroksicimetnih kiselina u listu maslačka.

Reagensi:

- 1) 0,5 M HCl
- 2) Arnou reagens – 10% w/v vodena otopina natrijevog nitrita i natrijevog molibdata
- 3) 8,5% vodena otopina natrijevog hidroksida

Aparatura i pribor:

- 1) odmjerne tikvice volumena 10-100 mL
- 2) epruvete
- 3) pipete volumena 0-10 mL
- 4) mikropipeta volumena 0-100 μ L
- 5) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje

6) spektrofotometar Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija).

Postupak rada:

Za određivanje udjela hidrokscimetnih kiselina, 500 μ L uzorka pomiješano je u epruveti s 1 mL 0,5M klorovodične kiseline, 1 mL Arnov reagensa, 1 mL otopine NaOH, te 1,5 mL destilirane vode. Apsorbancija je očitana odmah zatim na 490 nm, uz korištenje vode umjesto uzorka u pripremi reakcijske smjese. Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata kafeinske kiseline (CAE)/L ili g čestica.

$$y = 0,0025x + 0,0054$$

$$R^2 = 0,9954$$

gdje su:

x –koncentracija otopine kafeinske kiseline (mg/L)

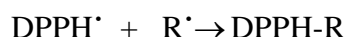
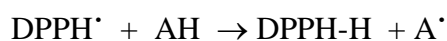
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm

baždarni pravac: ΔA (na y-osi) vs. c (mg/L kafeinske kiseline) na x-osi. Vrijednosti ΔA dobivaju se oduzimanjem apsorbancije svakog pojedinog uzorka od apsorbancije slijepe probe.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, a praćena je kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Reagensi:

- 1) metanol
- 2) 0,094 mM otopina 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal, DPPH

Aparatura i pribor:

- 1) Analitička vaga
- 2) Odmjerna tikvica volumena 100 mL
- 3) Epruvete
- 4) Mikropipeta volumena 100-1000 μ L
- 5) Pipeta volumena 10 mL
- 6) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 7) Spektrofotometar Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U tamnu epruvetu se otpipetira 100 μ L uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH (0,094 mM). Nakon 30 minuta po dodatku otopine DPPH mjeri se apsorbancija pri 515 nm, uz 100 μ L metanola umjesto uzorka kao slijepu probu. Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,603x + 0,006$$

gdje je: x- koncentracija standarda otopine Troloxa (mmol/L)

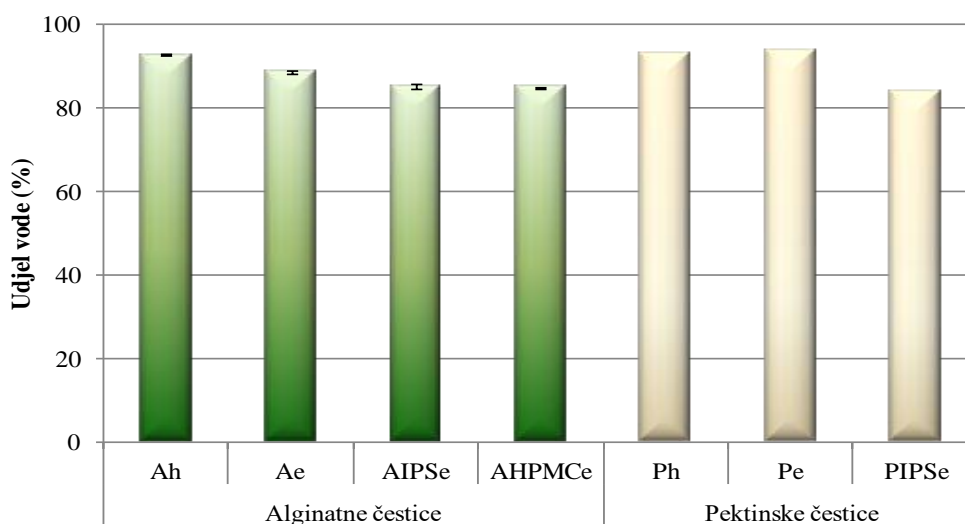
y- izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH metode provedeno je također u dvije paralelene probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol ekvivalenata Trolox-a/L.

4. REZULTATI

U ovom radu ispitana je mogućnost mikroinkapsulacije polifenolnih spojeva ekstrakta maslačaka ionskim geliranjem emulzija, pri čemu su kao nosači korišteni alginat i pektin te njihove mješavine s proteinima sirutke i derivatima celuloze. Učinkovitost postupka mikroinkapsulacije u emulzijama određena je usporedbom s kontrolnim česticama formiranim u hidrofilnim uvjetima. Dobiveni rezultati prikazuju udjel vode određen prema AOAC 930.15 metodi (slika 7), parametre raspodjele veličine čestica primjenom laserske difrakcije (tablica 4) te morfološke karakteristike primjenom optičkog mikroskopa (slika 8). Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola određena primjenom Folin Ciocalteu reagensa, hidrokisicimernih kiselina s Arnow reagensom i antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom prikazana je na slici 9, kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva iz hidrogel mikročestica na slikama 10 i 11 te omjer povećanja mase čestica nakon rehidracije *Swelling* metodom u tablici 5.

4.1. Usporedba udjela vode u formuliranim mikročesticama



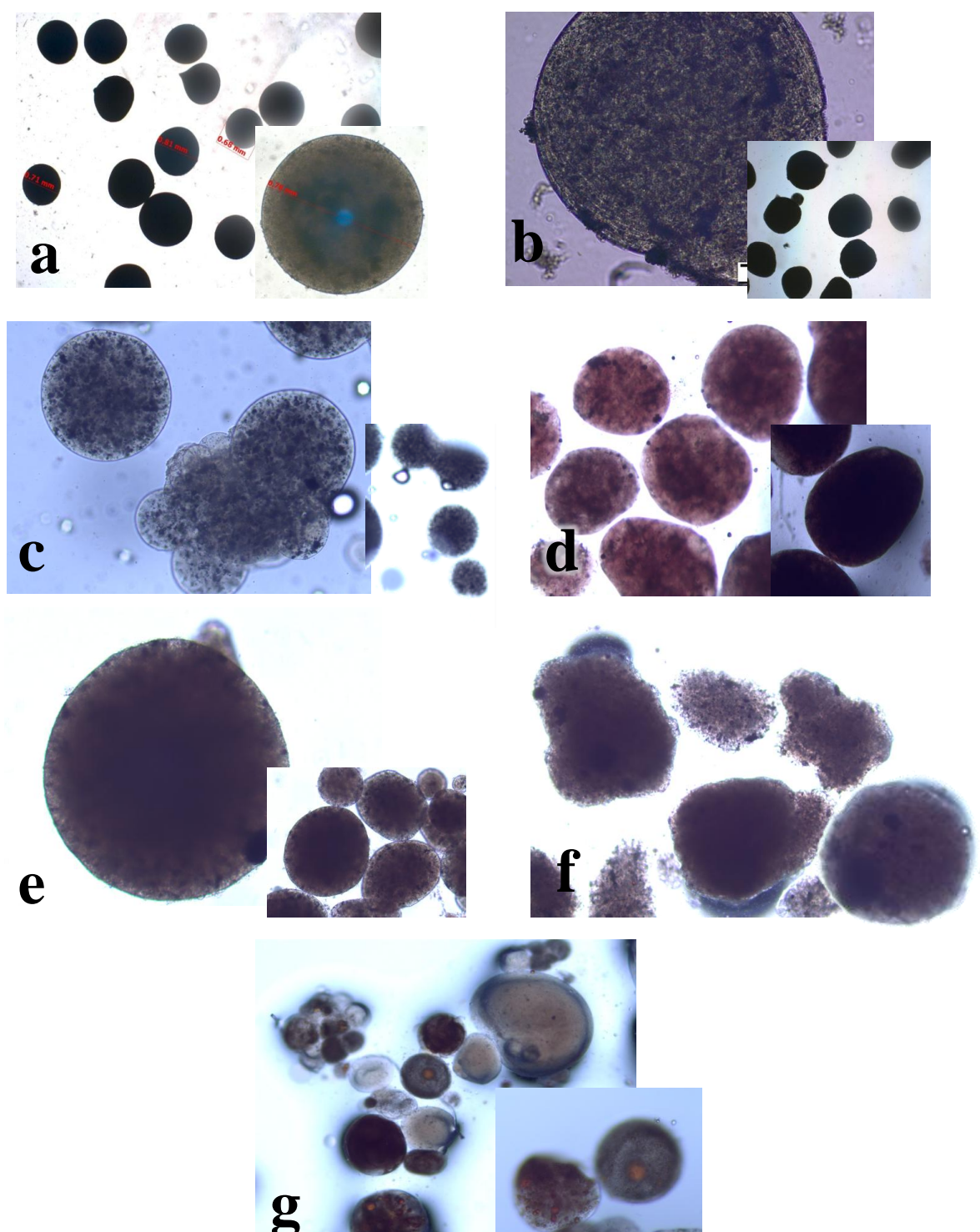
Slika 7. Udjel vode u formuliranim kontrolnim hidrofilnim (*h*) i česticama formiranim u emulzijama (*e*) od alginata (*A*) i pektina (*P*) te njihovih mješavina s proteinima sirutke (*IPS*) i celulozom (*HPMC*), određen prema AOAC 930.15 metodi

4.2. Parametri raspodjele veličina čestica i izgled čestica

Tablica 4. Parametri raspodjele veličine formuliranih kontrolnih hidrofilnih (*h*) i čestica formiranih u emulzijama (*e*), analiziranih primjenom laserske difrakcije

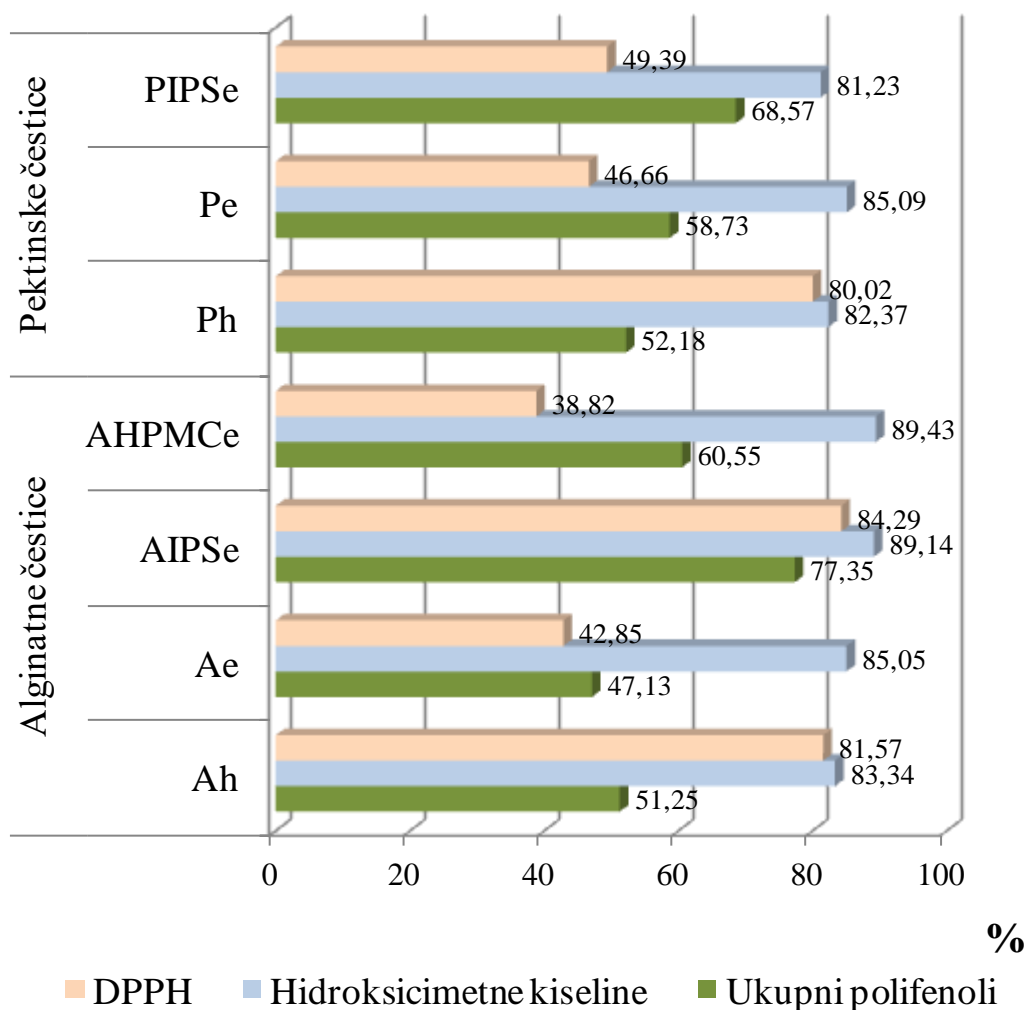
	Veličina čestica			
	<i>d</i> (0,1)	<i>d</i> (0,5)	<i>d</i> (0,9)	PSD raspon
<i>A_h</i>	-	2150 ± 150,00	-	-
<i>P_h</i>	-	2250 ± 100,00	-	-
<i>A_e</i>	19,63 ± 5,05	43,43 ± 6,39	695,40 ± 28,94	15,56
<i>P_e</i>	266,98 ± 10,20	595,98 ± 37,45	882,46 ± 30,81	1,03
<i>AWP_e</i>	177,64 ± 7,35	318,48 ± 15,08	586,81 ± 41,09	1,28
<i>PWP_e</i>	629,06 ± 41,07	878,35 ± 50,27	1367,24 ± 60,87	0,84
<i>AHPMC_e</i>	104,64 ± 0,36	354,24 ± 2,46	870,30 ± 9,74	2,16

A_h – alginatne, **P_h** – pektinske, **A_e** - alginatne dobivene u emulzijama, **P_e** - pektinske dobivene u emulzijama, **AIPSe** - alginatne s proteinima sirutke, **PIPSe** - pektinke s proteinima sirutke, **AHPMCE** - alginatne s hidroksi-propil metilcelulozom



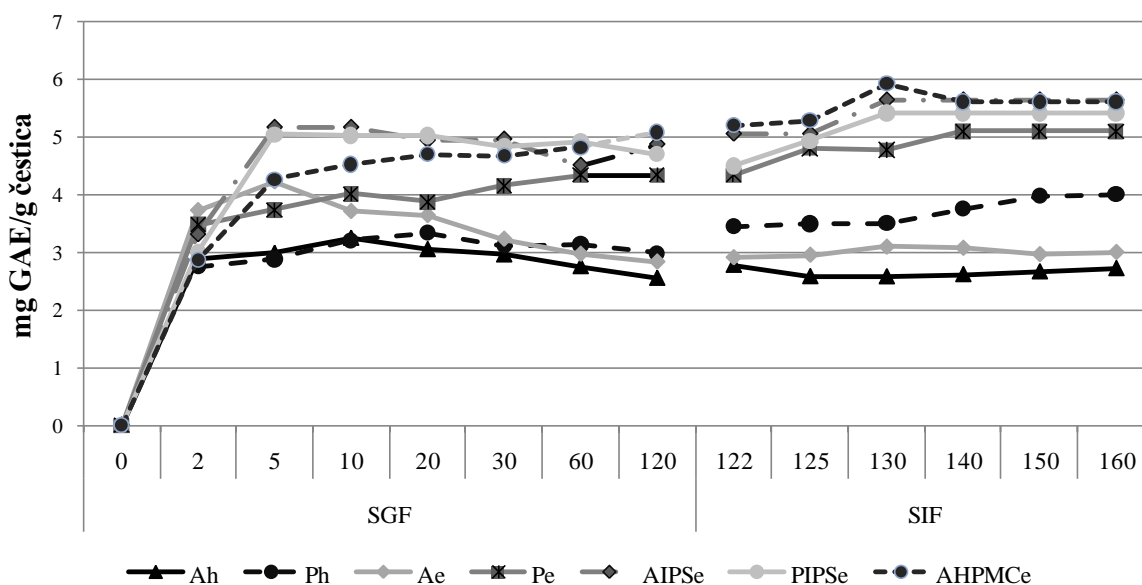
Slika 8. Fotografije optičke mikroskopije hidrogel mikročestica a) alginatnih (Ah), b) pektinskih (Ph), c) alginatnih dobivenih u emulzijama (Ae), d) pektinskih dobivenih u emulzijama (Pe), e) alginatnih s proteinima sirutke (AIPSe), f) pektinskih s proteinima sirutke (PIPSe) te g) alginatnih s hidroksi-propil metilcelulozom (AHPMCe)

4.3. Usporedba inkapsulacijske učinkovitosti različitih sustava nosača

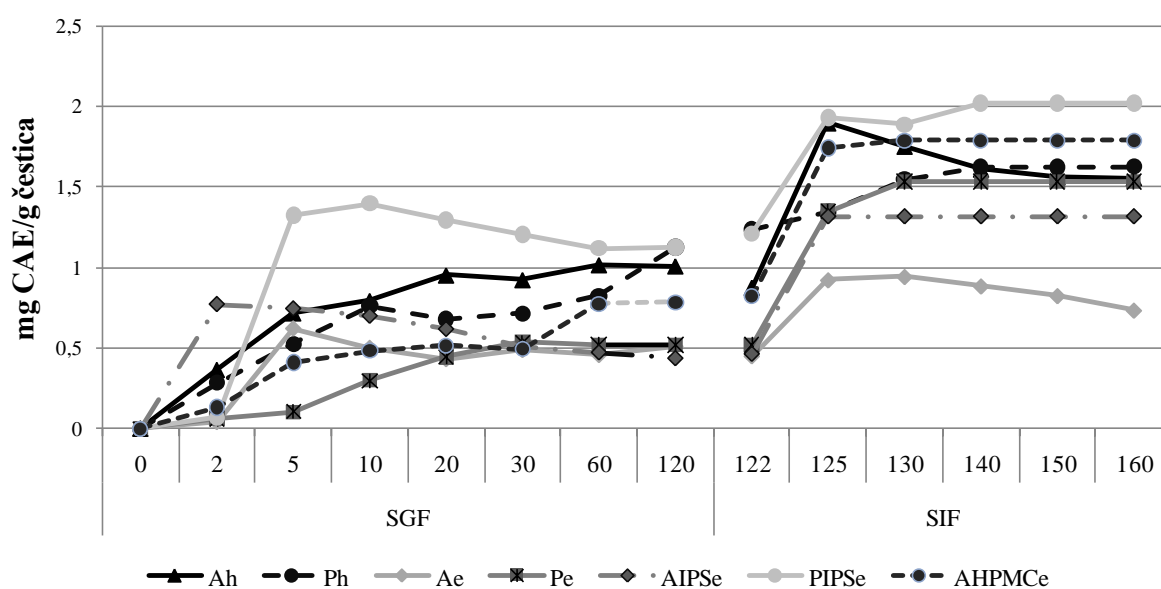


Slika 9. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina (reakcija s Arnou reagensom) te zadržanog antioksidacijskog kapaciteta (DPPH metoda) u formuliranim kontrolnim hidrofилnim (*h*) i česticama formiranim u emulzijama (*e*) od alginata (*A*) i pektina (*P*) te njihovih mješavina s proteinima sirutke (*IPS*) i celulozom (*HPMC*)

4.4. Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva iz hidrogel mikročestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u gastrointestinalnim tekućinama



Slika 10. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola iz formuliranih hidrogel mikročestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima



Slika 11. Kinetika otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz formuliranih hidrogel mikročestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

4.5. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode

Tablica 5. Omjer povećanja mase nastale usred vezanja vode (bubrenja) u liofiliziranim česticama proveden *Swelling* metodom

	*SR _{30min}	SR _{1h}	SR _{2h}	SR _{4h}	SR _{24h}
2% Ah	2,5904	2,6952	2,6857	2,7619	3,1238
2% Ae	2,3113	1,3679	0,7547	0,3491	0,3019
AiPSe	1,2617	0,8598	0,0841	0,0841	0,0187
AHPMCe	0,1852	0,0648	/	/	/
2% Pe	2,2143	1,3929	1,0893	0,2589	0,9286
PiPSe	0,3495	0,0583	/	/	/

*SR – „swelling ratio“

Ah – alginatne, **Ph** – pektinske, **Ae** - alginatne dobivene u emulzijama, **Pe** - pektinske dobivene u emulzijama, **AIPSe** - alginatne s proteinima sirutke, **PIPSe** - pektinke s proteinima sirutke, **AHPMCe** - alginatne s hidroksi-propil metilcelulozom

5. RASPRAVA

5.1. Udjel vode u mikročesticama

Slika 7 prikazuje udjel vode u formuliranim alginatnim i pektinskim mikročesticama određen iz omjera masa uzoraka prije i nakon sušenja.

Na osnovu dobivenih rezultata vidljivo je da je veći udjel vode zadržan u česticama dobivenim ionskim geliranjem alginata i pektina (kontrolne čestice) u hidrofilnim uvjetima. Također, veći udjel vode zadržan je u pektinskim česticama (dobivenima i u hidrofilnim uvjetima i u emulzijama) u odnosu na alginatne. Naime, već su prethodna istraživanja potvrdila da se ionskim geliranjem prirodnih biopolimera veže velika količina vode unutar gela (Souza i sur., 2012). Nedavno objavljena istraživanja (Tello i sur., 2015) potvrđuju da alginatne i pektinske mikročestice sadrže visoki udjel vode (94 do 96%), što je u skladu s rezultatima u ovom radu, budući da udjel vode u formiranim česticama varira od 83,90% do 93,73%. Rezultati pokazuju da čestice dobivene s biopolimerima, kao što su alginat i pektin tvore trodimenzionalne hidrofilne veze s visokim kapacitetom za zadržavanje vode.

Prema dobivenim rezultatima, najveći udjel vode sadrže pektinske čestice dobivene u emulzijama (Pe), a zatim slijede kontrolne pektinske (Ph), alginatne čestice (Ah) i alginatne čestice dobivene u emulzijama (Ae). Nešto manji udjel vode određen je u alginatnim česticama s proteinima sirutke (AiPSe) i hidroksi-propil metilcelulozom (AHPMCE) te pektinskim česticama s proteinima sirutke (PiPSe) gdje je udjel vode <90%, što ukazuje na činjenicu da uvođenje drugih biopolimera kao nosača u gel mrežu alginata i pektina zauzima intersticijalne prostore unutar čestica i na taj način smanjuje udjel vode u matriksu gela.

5.2. Raspodjela veličina i izgled alginatnih i pektinskih čestica

Tablica 4 prikazuje parametre raspodjele veličine dobivenih alginatnih i pektinskih čestica kombiniranih s različitim nosačima, a slika 8 njihovu veličinu i oblik.

Uzimajući u obzir medijan promjera čestica $d_{0.5}$, najveću veličinu čestica pokazuju pektinske čestice (Ph) kod kojih 50% čestica ima promjer manji i 50% čestica promjer veći od $2250 \pm 100.00 \mu\text{m}$ te alginatne čestice (Ah) s promjerom od $2150 \pm 150.00 \mu\text{m}$. S obzirom na

način dobivanja ovih čestica, koji uključuje jednostavnu metodu ukapavanja i geliranje u hidrofilnim uvjetima, veličina dobivenih čestica od $\geq 2\mu\text{m}$ u skladu je s očekivanjima.

Primjenom metode emulzifikacije i ionskog geliranja u emulzijama značajno je smanjena veličina čestica do mikro razmjera, te se ova tehnika, primjenom svih korištenih materijala i kombinacija nosača može smatrati tehnikom mikroinkapsulacije. Smanjenje veličine mikročestica može se objasniti smanjenjem površinske napetosti uzrokovano djelovanjem surfaktanta na granici ulje-voda i/ili zbog porasta količine surfaktanta koji prelazi iz uljne u vodenu fazu, a rezultira manjim česticama formiranim na granici (Đorđević i sur., 2014).

Među česticama dobivenima u emulzijama najveću veličinu, prema parametru $d_{0.5}$ pokazale su pektinske čestice s proteinima sirutke (PiPSe) čiji je srednji promjer $d_{0.5} = 589,75 \pm 50,27 \mu\text{m}$ i pektinske čestice dobivene u emulzijama (Pe) – $595,98 \pm 37,45 \mu\text{m}$, što je u skladu s većim udjelom vode zadržanim u ovim česticama. Nakon toga, slijede alginatne čestice s hidroksi-propil metilcelulozom (AHPMce) – $354,24 \pm 2,46 \mu\text{m}$, alginatne čestice s proteinima sirutke (AiPSe) – $318,48 \pm 15,08 \mu\text{m}$ te najmanji promjer alginatnih čestica dobivenih u emulzijama (Ae) koji iznosi $43,43 \pm 6,39 \mu\text{m}$. Prema rezultatima dobivenim u ovom radu, pektinske čestice su veće od alginatnih čestica, što odgovara prijašnjim istraživanjima koje su proveli Tello i sur. (2015), zaključujući da se ovi rezultati najvjerojatnije mogu pripisati činjenici da se veći broj molekula vode može vezati na pektinske čestice formirajući umrežene strukture.

S obzirom na izgled i morfološke karakteristike čestica, hidrogel alginatne i pektinske čestice imale su najveću veličinu, ali su zadržale pravilan, sferičan oblik (Slika 8, a i b). Pektinske čestice dobivene u emulzijama i alginatne čestice s proteinima sirutke su manje veličine, ali također pravilnog, sferičnog oblika, premda se u usporedbi s hidrofilnim, kontrolnim česticama može primijetiti veća aglomeracija čestica (Slika 8, d i e). Manje alginatne čestice dobivene u emulzijama, a pektinske čestice s proteinima sirutke i alginatne čestice s hidroksi-propil metilcelulozom karakterizirane su nepravilnim oblikom, s obzirom da se mogu primijetiti veliki konglomerati, nehomogene strukture (Slika 8, c, f i g), što ukazuje da se ovom tehnikom djelovanjem octene kiseline nisu stigle razdvojiti pojedine čestice. Uključivanje drugih gelirajućih hidrokoloida rezultira pravilnijom površinom, ali manjom veličinom čestica (Totosaus i sur., 2013), što je utvrđeno i u ovom radu uključivanjem proteina sirutke u alginatne čestice.

5.3. Stupanj inkapsulacije

Slika 9 prikazuje inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina pri korištenju različitih kombinacija sustava alginata, pektina, proteina sirutke i celuloze. Alginatne čestice s proteinima sirutke karakterizira najveći postotak inkapsulacije ukupnih polifenolnih spojeva (77,35%) te vrlo visoka imobilizacija hidroksicimetnih kiselina (89,14%). Općenito se može primijetiti bolja inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola iz ekstrakta maslačka postiže u alginatnim česticama u odnosu na pektinske čestice. Alginatne čestice s hidroksi-propil metilcelulozom pokazuju najveću inkapsulacijsku učinkovitost hidroksicimetnih kiselina, čak 89,43%, a postotak inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola iznosi 60,55%.

Također se može primijetiti veća sposobnost zadržavanja hidroksicimetnih kiselina u formuliranim česticama, bez obzira na vrstu nosača, što ukazuje na velik afinitet ovih spojeva prema polisaharidnim i proteinskim materijalima korištenima kao nosači za inkapsulaciju. Ovakvi podaci također potvrđuju moguće kemijske interakcije između pojedinih hidroksicimetnih kiselina i polimernih nosača koji su omogućili njihovu bolju imobilizaciju u matriksu formiranih čestica. Najmanji udio hidroksicimetnih kiselina utvrđen je u pektinskim česticama s proteinima sirutke (81,23%). S druge strane, najmanji postotak inkapsulacije polifenola određen je u alginatnim česticama dobivenim u emulzijama (47,13%). Dobiveni rezultati potvrđuju da prisutnost proteina sirutke i celuloze, kao nosača u kombinaciji s alginatom, povećavaju sposobnost imobilizacije bioaktivnih spojeva maslačka.

Najveći antioksidacijski kapacitet postignut nakon inkapsulacije određen je u alginatnim česticama s proteinima sirutke (84,29%), dok je najmanji (38,82%) određen u alginatnim česticama s hidroksi-propil metilcelulozom. Nadalje, visoki postotak zadržanog antioksidacijskog kapaciteta nakon inkapsulacije uočen je u hidrofilnim alginatnim (81,57%) i pektinskim (80,02%) česticama, u kojima je i potvrđena korelacija visokog udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina sa zadržanim antioksidacijskim kapacitetom.

Usporedbom inkapsulacijske učinkovitosti s veličinom čestica vidljiv je obrnuto proporcionalni odnos, odnosno, najmanje alginatne čestice s proteinima sirutke i celulozom karakterizira najbolja inkapsulacijska učinkovitost te obrnuto. Ovakvi rezultati ukazuju da veličina čestica nije u zavisnosti o inkapsulacijskoj učinkovitosti i sposobnosti zadržavanja aktivnih sastojaka već vjerojatno ovisi o drugim fizikalnim čimbenicima.

Kombinacija alginata s proteinima sirutke je već primijenjena za inkapsulaciju različitih bioaktivnih tvari, posebno u farmaceutskoj industriji. Chen i suradnici (2007) su u

svojim istraživanjima koristili alginat s proteinima sirutke, kao nosač za imobilizaciju riboflavina te utvrdili dobru inkapsulacijsku učinkovitost riboflavina s navedenim nosačem. U prijašnjim istraživanjima (Déat-Lainé i sur., 2012) također je potvrđeno da se veća inkapsulacijska učinkovitost, u ovom slučaju inzulina, može postići pomoću alginatnih čestica u kombinaciji s proteinima sirutke, u odnosu na obične alginatne mikročestice, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu.

5.4. Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva

Određivanjem udjela ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina praćena je kinetika otpuštanja navedenih parametara u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima kao mediju, pri 37 °C.

Slika 10 prikazuje otpuštanje ukupnih polifenolnih spojeva iz hidrogel mikročestica. Kod svih sustava otpuštanje polifenola odvijalo se različitom kinetikom. Otpuštanje polifenola iz alginatnih čestica (Ah) odvija se vrlo brzo te se postiže ravnotežno stanje već nakon prvih 10 minuta. Slična kinetika otpuštanja uočena je i kod alginatnih čestica dobivenih u emulzijama (Ae) gdje se se ravnotežno stanje postiže već nakon 5 min. U slučaju alginatnih i pektinskih čestica s proteinima sirutke (AiPSe i PiPSe) otpuštanje se odvija također vrlo brzo, tijekom prvih 5 minuta nakon čega slijedi ravnotežno stanje, međutim u intestinalnim uvjetima ponovno dolazi do postepenog otpuštanja. Kod pektinskih čestica dobivenih u emulzijama (Pe) produljeno je otpuštanje u odnosu na ostale vrste čestica, jer se otpuštanje produljuje i do 140 minuta, a sami proces otpuštanja je kontinuiran za razliku od pektinskih čestica (Ph) gdje se otpuštanje odvija do 20 minute, a zatim se ponovno javlja u intestinalnim uvjetima koji potiču dodatno otpuštanje. Najbolji profil otpuštanja postignut je primjenom alginata s hidroksi-propil metilcelulozom (AHPMCE) kao nosača, gdje je uočen najsporiji profil otpuštanja polifenolnih spojeva u gastrointestinalnim uvjetima koji se kontinuirano otpuštaju do 130 minute, nakon čega se postiže ravnotežno stanje.

Slika 11 prikazuje otpuštanje ukupnih hidrokscimetnih kiselina iz formuliranih hidrogel mikročestica. Profil otpuštanja u gastičnim uvjetima značajno se razlikuje u odnosu na kinetiku otpuštanja ukupnih polifenolnih spojeva. Najveće otpuštanje hidrokscimetnih kiselina primjećeno je između 125 – 140 minute, u intestinalnim uvjetima, nakon čega dolazi do uspostavljanja ravnoteže, a u slučaju pektinskih čestica i alginatnih čestica dobivenih u

emulzijama i do smanjenja udjela hidroksicimetnih kiselina, što se može objasniti ponovnom difuzijom hidroksicimetnih kiselina u matriks čestica, nakon postizanja ravnotežnog stanja (istog gradijenta koncentracije).

Kao najbolji sustav nosača za postizanje kontroliranog otpuštanja polifenolnih spojeva pokazao se alginatni s hidroksi-propil metilcelulozom (AHPM_{Ce}), budući da ovaj sustav omogućava i imobilizaciju najvećeg udjela polifenola (u 130 minuti – 6 mg GAE/g čestica).

5.5. Povećanje mase nakon vezanja vode

Praćenje omjera povećanja mase nastale usred vezanja vode (bubrenja) u liofiliziranim česticama prikazuje tablica 5.

Na osnovu analiziranih rezultata vidljivo je da najveći omjer povećanja mase vezanjem vode pokazuju 2% alginatne kontrolne čestice (Ah), pri kojima dolazi do postepenog povećanja mase s vremenom, gdje je i nakon 24 sata omjer masa iznosio 3,1238, što se može pripisati poroznosti hidrofilnih čestica dobivenih ionskim geliranjem. Manje vezanje vode nakon 24 sata pokazuju pektinske čestice dobivene u emulzijama (Pe) čiji je omjer masa iznosio 0,9286, zatim slijede alginatne čestice dobivene u emulzijama (Ae) sa omjerom masa 0,3019, alginatne čestice s proteinima sirutke (AiPSe) - 0,0187 te pektinske čestice s proteinima sirutke (PiPSe) i alginatne čestice s hidroksi-propil metilcelulozom (AHPM_{Ce}) koje su se već nakon 2 sata u potpunosti razgradile zbog svoje male veličine i procesa miješanja.

Usporedbom omjera povećanja mase s veličinom čestica vidljiv je proporcionalni odnos. Najveće alginatne čestice karakterizira najveći omjer povećanja mase nakon vezanja vode, dok najmanje alginatne čestice s hidroksi-propil metil celulozom najmanje bubre, odnosno, najbrže se razgrade. Ovakvi rezultati upućuju na činjenicu da se kao mehanizam otpuštanja aktivnih sastojaka iz mikročestica formuliranih na ovaj način ne odvija difuzija već neki drugi fizikalni proces koji rezultira degradacijom polimera.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom završnom radu doneseni su sljedeći zaključci:

1. Metoda ionskog geliranja u emulzijama pokazala se učinkovitom tehnikom mikroinkapsulacije polifenolnih spojeva ekstrakta maslačka.
2. Primjena pektina kao nosača za inkapsulaciju rezultira većim česticama (u odnosu na alginatne čestice) s većim udjelom zadržane vode.
3. Primjenom proteina sirutke i hidroksi-propil metilceluloze kao nosača za inkapsulaciju postiže se povećanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina.
4. Kombinacijom alginata s proteinima sirutke postignuta je najveća inkapsulacijska učinkovitost polifenolnih spojeva ekstrakta maslačka (77,35%), dok su najmanju učinkovitost inkapsulacije (47,13%) pokazale alginatne čestice dobivene u emulzijama.
5. Alginatne čestice s hidroksi-propil metilcelulozom pokazale su najveću inkapsulacijsku učinkovitost hidroksicimetnih kiselina (89,43%).
6. Bolja imobilizacija ukupnih polifenola iz ekstrakta maslačka postiže s alginatnim česticama u odnosu na pektinske čestice.
7. Inkapsulacijska učinkovitost obrnuto je proporcionalna veličini čestica – manje alginatne čestice s proteinima sirutke i alginatne čestice s hidroksi-propil metilcelulozom rezultirale su najboljom inkapsulacijskom učinkovitošću i obrnuto.
8. Alginatne čestice s hidroksi-propil metil celulozom pokazale su optimalnu (najsporiju) kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.
9. Kao najbolji sustav za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva maslačka metodom ionskog geliranja emulzija pokazao se alginatni s proteinima sirutke, budući da su nastale čestice pravilnog oblika, s najvećom učinkovitošću inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina.

7. LITERATURA

Bajpai, S.K., Sharma S. (2004) Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *React. Funct. Polym.* **59**, 129-140.

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., Cesàro, A. (2010) Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chem.* **122**, 416-423.

Chen, H.J., Inbaraj, B.S., Chen, B.H. (2012) Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *Int. J. Mol. Sci.* **13(1)**, 260-285.

Chen, L., Subirade, M. (2007) Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65(3)**, 354-362.

Chen, L.G., Remondetto, G.E., Subirade, M. (2006) Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 272-283.

Chkhikvishvili, I.D., Kharebava, G.I. (2001) Chicoric and chlorogenic acids in plant species from Georgia. *Appl. Biochem. Microbiol.* **37(2)**, 188-191.

Chun, K.H., Kwon, I.C., Kim, Y.H., La, S.B., Sohn, L.T., Jeong, S.Y. (1996) Preparation of sodium alginate microspheres containing hydrophilic β -lactam antibiotics. *Arch. Pharm. Res.* **19(2)**, 106-116.

Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry. Technol.* **23(7)**, 1361-1394.

Déat-Lainé, E., Hoffart, V., Cardot, J.M., Subirade, M., Beyssac, E. (2012) Development and *in vitro* characterization of insulin loaded whey protein and alginate microparticles. *Int. J. Pharm.* **439(1-2)**, 136-144.

Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N.P. (2012) Role of calcium alginate and mannitol in protecting *Bifidobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78(19)**, 6914-6921.

Dubey, R., Shami, T.C., Bhasker Rao, K.U. (2009) Microencapsulation technology and applications. *Defen. Sci. J.* **59**, 82-95.

Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2014) Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Eng. Rev.*

Erhatic, R., Vukobratović, M., Dudaš, S., Mužić, M. (2015) Kemijske karakteristike populacija maslačka s Križevačkog i Riječkog područja. *Agronomski glasnik* **76(3)**, 127-136.

Fundueanu, G., Nastuzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J., Rinaudo, M. (1999) Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials* **20**, 1427-1435.

Georgiev Ivanov, I. (2014) Polyphenols content and antioxidant activities of *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (dandelion) leaves. *Int. J. Pharm. Phyt. Res.* **6(4)**, 889-893.

Ghosh, S.K. (2006) Functional coatings and microencapsulation: A general perspective. U: Functional coatings: by polymer microencapsulation, (Ghosh, S.K., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 1-28.

Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.H. (1999) Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **50**, 213-224.

González-Castejón, M., Visioli, F., Rodriguez-Casado, A. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Int. Life Sci. Inst.* **70(9)**, 534-547.

González-Rodríguez, M.L., Holgado, M.A., Sánchez-Lafuente, C., Rabasco, A.M., Fini, A. (2002) Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int. J. Pharm.* **232**, 225-234.

Hu, C., Kitts, D.D. (2004) Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **265**, 107-113.

Jacobsen, C., Skall Nielsen, N., Frisenfeldt Horn, A., Moltke Sørensen, A.D. (2013) Food enrichment with omega-3 fatty acids, Woodhead publishing, Oxford/Cambridge/Philadelphia/New Delhi.

Jiménez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 287-306.

Jyothi, N., Prasanna, M., Prabha, S., Seetha Ramaiah, P., Srawan, G., Sakarkar, S. (2008) Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency: a review. *Internet J. of Nanotechnol.* **3(1)**, 1-11.

Jyothi Sri, S., Seethadevi, A., Suria Prabha, K., Muthuprasanna, P., Pavitra, P. (2012) Microencapsulation: a review. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **3**, 509-531.

Kaimainen, M., Marze, S., Järvenpää, E., Anton, M., Huopalahti, R. (2015) Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during *in vitro* intestinal lipid digestion. *Food Sci. Technol.* **60**, 899-904.

Khalid, N., Kobayashi, I., Neves, M.A., Uemura, K., Nakajima, M., Nabetani, H. (2014) Monodisperse w/o/w emulsions encapsulating l-ascorbic acid: Insights on their formulation using microchannel emulsification and stability studies. *Colloid Surface A.* **458**, 69-77.

Khosravi Zanjani, M.A., Tarzi, B.G., Sharifan, A., Mohammadi, N. (2014) Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian J. Pharm. Res.* **13(3)**, 843-852.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004) The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **14**, 737-743.

Krstonošić, V., Dokić, L.J., Dapčević, P. (2009) Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. *Food Hydrocolloid.* **23(8)**, 2212-2218.

Kuo, C.K., Ma, P.X. (2001) Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **22**, 511-521.

Lee, B.R., Lee, J.H., An, H.J. (2012) Effects of *Taraxacum officinale* on fatigue and immunological parameters in mice. *Molecules* **17**, 13253-13265.

Lelas, V. (2008) *Procesi primpreme hrane, Golden marketing-Tehnička knjiga*, Zagreb.

Li, Y., Zheng, J., Xiao, H., McClements, D.J. (2012) Nanoemulsion-based delivery systems for poorly watersoluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. *Food Hydrocolloid.* **27(2)**, 517-528.

Lemoine, D., Wauters, F., Bouchend'homme, S., Pr at, V. (1998) Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen. *Int. J. Pharm.* **176**, 9-19.

Lupo, B., Maestro, A., Porras, M., Gutiérrez, J.M., González, C. (2014) Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids.* **38**, 56-65.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., R m sy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.

Masalova, O., Kulikouskaya V., Shutava, T., Agabekov, V. (2013) Alginate and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrapment. *Phys. Procedia.* **40**, 69-75.

- Mohanraj, V.J., Chen, Y. (2006) Nanoparticles-a review. *Trop. J. Pharm. Res.* **5(1)**, 561-573.
- Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* **1**, 1806-1815.
- Ong, W.D., Tey, B.T., Quek, S.Y., Tang, S.Y., Chan, E.S. (2014) Alginate-based emulsion template containing high oil loading stabilized by nonionic surfactants. *J. Food Sci.* **00**, 1-8.
- Park, C.M., Jin, K.S., Lee, Y.W., Song, Y.S. (2011) Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF- κ B translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **660**,454-459.
- Park, H.J., Ye, M., Park, K. (2005) Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules* **10**, 146-161.
- Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M. (2012) A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 27-32.
- Racoviță, S., Vasiliu, S., Popa, M., Luca, C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie* **54(9)**, 709-718.
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Vilela, S., Ribeiro, A.J., Veiga, F. (2006) Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J. Microencapsul.* **23(3)**, 245-257.
- Sampath Kumar, K.P, Tejbe, S.K., Banu, S., Lakshmi, P.N., Bhowmik, D. (2013) Microencapsulation technology. *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.* **1(3)**, 324-328.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Gonçalves, A.R., Veiga, F. (2006) Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *Int. J. Pharm.* **311**, 1-10.

Singh, M.N., Hemant, K.S.Y., Ram, M., Shivakumar, H.G. (2010) Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Res. Pharm. Sci.* **5(2)**, 65-77.

Soni, M.L, Kumar, M., Namdeo, K.P. (2010) Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and *in vitro* evaluation. *Int. J. Drug Deliv.* **2**, 64-68.

Souza, F.N., Gebara, C., Ribeiro, M.C.E., Chaves, K.S., Gigante, M.L., Grosso, C.R.F. (2012) Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food. Res. Int.* **49**, 560-566.

Srivastava, Y., Semwal, A.D., Sharma, G.K. (2013) Application of various chemical and mechanical microencapsulation techniques in food sector- A review. *Int. J. of Food. Ferment. Technol.* **3(1)**, 1-13.

Tello, F., Falfan-Cortés, R.N., Martines-Bustos, F., Martins da Silva, V., Hubinger, Grosso, C. (2015) Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloid.* **43**, 670-678.

Totosaus, A., Ariza-Ortega, T., Pérez-Chabela, M. (2013) Lactic acid bacteria microencapsulation in sodium alginate and other gelling hydrocolloids mixtures. *J. Food Nutr. Res.* **52**, 107-120.

Xu, Y., Zhan, C., Fan, L., Wang, L., Zheng, H. (2007) Preparation of dual crosslinked alginate-chitosan blend gel beads and *in vitro* controlled release in oral site-specific drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **336**, 329-337.