

Metode stabilizacije ekstrakata i njihova primjena u prehrambenoj industriji

Škrtić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:605225>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij
Prehrambena tehnologija**

Petra Škrtić

7064/PT

**METODE STABILIZACIJE EKSTRAKATA I NJIHOVA
PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

„Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja” (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost

Mentor: *prof. dr.sc. Anet Režek Jambrak*

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za opće programe

Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

METODE STABILIZACIJE EKSTRAKATA I NJIHOVA PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Petra Škrtić, 0058206648

Sažetak: Postoje različite metode stabilizacije ekstrakata, a najčešće se koriste metode sušenja raspršivanjem, koacervacija i liofilizacija koje imaju široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Ovaj rad daje teoretski pregled različitih metoda stabilizacije ekstrakata te je također eksperimentalno proveden postupak inkapsulacije biljnog ekstrakta kadulje. Rezultati su pokazali da je veća razina ukupnih polifenola nakon otpuštanja kapsula u soku nego u vodi jer sok od jabuke već ima svoje prirodno prisutne polifenole. Dobiveni rezultati pokazali su da je za otpuštanje polifenola iz suhih mikrosfera bilo potrebno duže vrijeme nego za otpuštanje polifenola u mokrim mikrosferama te zbog navedenog svojstva mogu imati različitu primjenu za potrebe prehrambene ili farmaceutske industrije.

Ključne riječi: ekstrakti, inkapsulacija, kadulja, mikrosfere, stabilizacija

Rad sadrži: 35 stranica, 7 slika, 1 tablica, 51 literarnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Mentor: *prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak*

Pomoć pri izradi: *Marinela Nutrizio, mag. nutr., asistent na projektu*

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of general programs

Laboratory for Sustainable Development

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ENCAPSULATION STABILISATION METHODS AND THEIR USE IN THE FOOD INDUSTRY

Petra Škrtić, 0058206648

Abstract: There are various methods of stabilization of extracts, and the most commonly used methods are spray drying, coacervation and lyophilization, which are widely used in the food and pharmaceutical industries. This paper provides a theoretical overview of different methods of stabilization of extracts and also experimentally investigated the release of polyphenols from extracts in different media, apple juice and water. The results showed that the level of total polyphenols after microsphere release is higher in the juice than in water because apple juice already has its naturally present polyphenols. The obtained results showed that the release of polyphenols from dry microspheres took longer than the release of polyphenols in wet microspheres and due to this, they may have different applications for the needs of the food or pharmaceutical industry.

Keywords: encapsulation, extract, microspheres, sage, stabilisation

Thesis contains: 35 pages, 7 figures, 1 table, 51 references

Original in: Croatian

Mentor: *Professor Anet Režek Jambrak, PhD*

Technical support and assistance: *Marinela Nutrizio, MSci, Research assistant*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Fitokemikalije	2
2.2. Ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala	2
2.2.1. Primjer tradicionalnih metoda ekstrakcije	2
2.2.2. Primjer modernih metoda ekstrakcije	3
2.3. Kadulja.....	3
2.3.1. Bioaktivni spojevi u kadulji	4
2.4. Inkapsulacija	6
2.4.2.1. Sušenje raspršivanjem.....	9
2.4.2.2. Elektroraspršivanje.....	12
2.4.2.3. Elektropredenje	13
2.4.2.4. Elektrozamrzavanje	16
2.4.2.6. Liofilizacija.....	16
2.4.2.7. Koacervacija	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Uzorci.....	18
3.1.2. Reagensi	18
3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor	18
3.2. Metode rada	19
3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	19
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola (UF)	20
3.2.4. Inkapsulacija	21
3.2.5. Otpuštanje mikrosfera	21
3.2.6. Određivanje sadržaja vlage u mikrosferama	21
3.2.7. Inkapsulacijska učinkovitost	22
3.2.8. Određivanje kapaciteta punjenja.....	22
3.2.9. Bubrenje	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA.....	28

1. UVOD

Mnoge industrije, prvenstveno prehrambena i farmaceutska industrija, u novije vrijeme razvijaju nove funkcionalne prehrambene i kozmetičke proizvode zbog sve većih kriterija svojih potrošača. Takvi novi proizvodi su obogaćeni različitim bioaktivnim komponentama kao što su fitokemikalije koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Fitokemikalije su spojevi koji proizvode biljke, a nalaze se u voću, povrću, žitaricama, začinskom bilju i drugim biljkama. Fitokemikalije imaju brojne zdravstvene pogodnosti za imunološki sustav čovjeka i imaju zaštitnu ulogu protiv nekih kroničnih bolesti. Polifenoli su kategorija fitokemikalija i predstavljaju veliku skupinu sekundarnih metabolita u biljaka. Sve je veći interes za izoliranjem ovih fitokemikalija iz biljnog materijala.

Bioaktivne komponente se mogu izdvojiti ekstrakcijom koja se temelji na odvajanju tvari biljnog (ili životinjskog) tkiva upotrebom različitih vrsta otapala te postoje razne konvencionalne metode i nove alternativne metode za ekstrakciju polifenola iz različitih biljaka. No, zbog svoje nestabilnosti u ljudskom organizmu, bioaktivne komponente je vrlo važno zaštititi te se za tu svrhu kao zaštita bioaktivnih komponenata koriste različite tehnike stabilizacije ekstrakata kao što su sušenje raspršivanjem, elektropredenje i liofilizacija. Metode stabilizacije ekstrakata imaju široku primjenu u različitim industrijama jer su jednostavne, brze i efikasne.

Cilj ovog rada je teoretski proučiti različite metode stabilizacije biljnih ekstrakata, a također je proveden eksperimentalni dio s jednom od metoda stabilizacije ekstrakata, inkapsulacijom s kojom je analizirano otpuštanje polifenola i antioksidacijska aktivnost iz inkapsuliranog ekstrakta kadulje u mokrim i osušenim mikrosferama u različitim medijima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Fitokemikalije

Fitokemikalije su biljne kemikalije koje obuhvaćaju širok spektar bioaktivnih spojeva koji se prirodno javljaju u biljkama. Bioaktivni spojevi imaju sposobnost interakcije s jednom ili više komponenata živog tkiva što omogućava veliko djelovanje na zaštitu tog tkiva. Fitokemikalije su podijeljene u šest glavnih kategorija na temelju njihove kemijske strukture i karakteristika: ugljikohidrati, lipidi, fenoli, terpenoidi i alkaloidi te drugi spojevi koji sadrže dušik (Ghoshal, 2018). Polifenoli spadaju u fitokemikalije, a oni predstavljaju veliku grupu sekundarnih metabolita biljaka i imaju mnogo važnih bioloških funkcija kao što su antioksidacijska, antimikrobna, antialergijska i antikancerogena svojstva (Ben El Hadj Ali i sur., 2014).

2.2. Ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala

Generalno gledajući, tekući i sušeni biljni ekstrakti koji su bogati aktivnim tvarima često se upotrebljavaju u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Wang i Weller, 2006). Sve je veći interes za ekstrakcijom polifenola iz biljnog materijala kako bi se u usporedbi sa sintetski dobivenim komponentama koji često imaju toksična svojstva dobila sigurnija, prirodnija i jeftinija varijanta. S obzirom na to da se polifenoli dobiveni iz različitih vrsta biljaka međusobno razlikuju po strukturi, nije moguće odrediti jedinstvenu metodu ekstrakcije koja bi mogla ekstrahirati sve važne komponente iz različitih biljaka (Bucić-Kojić i sur., 2011). Ekstrakti polifenola se često koriste u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te je zato odabir otapala za ekstrakciju vrlo bitan. Za ekstrakciju polifenola kao otapalo se najčešće koriste voda, etanol, metanol te njihove mješavine. Postoje tradicionalne i moderne ekstrakcijske metode. Tradicionalne metode ekstrakcije kao što su maceracija i ekstrakcija potpomognuta toplinom su jednostavne metode i mogu se primjenjivati za ekstrakciju polifenola iz različitog biljnog materijala. U novije vrijeme sve se češće koriste moderne metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ili ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (Both et al., 2014).

2.2.1. Primjer tradicionalnih metoda ekstrakcije

- Maceracija

Maceracija je tradicionalna i jednostavna metoda dobivanja polifenola ekstrakcijom iz biljnog materijala. Odvija se na sobnoj temperaturi u staklenim čašama ili posudama neprestano miješajući deset do trideset minuta ili nekoliko sati, ovisno o strukturi i karakteristikama biljke

iz koje se želi izolirati polifenoli. Naposljetku dolazi do ekstrakcije na temelju zakonitosti difuzije polifenola u odgovarajućem ekstrakcijskom mediju (Vuleta i sur., 2012).

- Ekstrakcija potpomognuta toplotom

Toplinom potpomognuta ekstrakcija se provodi na visokoj temperaturi u staklenim posudama neprestanim miješanjem u vodenoj kupelji. Visoka temperatura smanjuje viskoznost ekstrakcijskog medija koja pomaže otapalu da prodire u biljni matriks i naposljetku dolazi do brže kinetike (Miron i sur., 2011).

2.2.2. Primjer modernih metoda ekstrakcije

- Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija se provodi korištenjem ultrazvučne kupelji. Mehanizam ultrazvukom potpomognute ekstrakcije uključuje uništenje biljnog tkiva ultrazvučnim valovima koje putuju unutar biljnih stanica kao mehaničke vibracije i uzrokuju ekspanzijske i kompresijske intervale tijekom kretanja kroz ekstrakcijski medij (Wang i Weller, 2006).

- Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Moderne metode ekstrakcije kao što je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima sve se više koristi kao alternativa klasičnim metodama za ekstrakciju polifenola s ciljem poboljšanja i povećanja učinkovitosti ekstrakcije. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima se može provoditi pomoću mikrovalne peći ili mikrovalnog reaktora. Mikrovalovi pružaju veliki dovod energije koja dovodi do učinkovitog i homogenog zagrijavanja uzorka (Wang i Weller, 2006).

2.3. Kadulja

Rod *Salvia*, najveći je član obitelji Lamiacea ili mente. Biljke su uglavnom aromatične i trajne. Mnoge vrste roda *Salvia*, uključujući vrstu *Salvia officinalis* (kadulja) su rasprostranjene na mediteranskom području i u svijetu se koriste kao začini, ali i u tradicionalnoj biljnoj medicini (Hamidpour i sur., 2014)

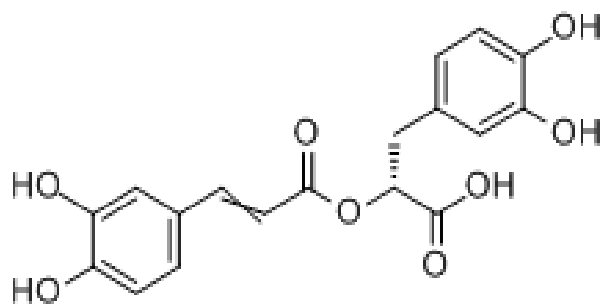


Slika 1. *Salvia officinalis* (kadulja) (Anonymous 1, 2017)

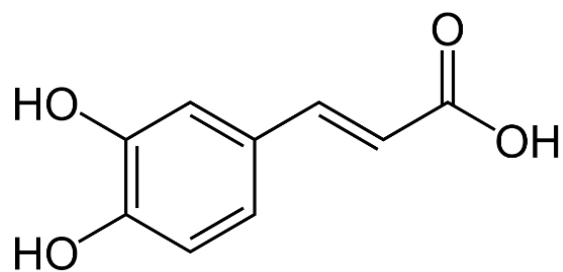
2.3.1. Bioaktivni spojevi u kadulji

Kadulja je prirodni izvor flavonoida i polifenolnih spojeva (karnozinska kiselina, ružmarinska kiselina i kofeinska kiselina) koji posjeduju snažno antioksidativno i antibakterijsko djelovanje. Kofeinska kiselina ima glavnu ulogu u biokemiji porodice Lamiaceae i pojavljuje se najčešće u dimernom obliku kao ružmarinska kiselina. Karnozinska i ružmarinska kiselina, koje su prisutne u visokoj koncentraciji u ekstraktima kadulje su u brojnim istraživanjima pokazala snažna antioksidacijska svojstva. Eterično ulje vrsta *Salvia* ima različite sastave ovisno o genetskim, klimatskim, sezonskim čimbenicima i čimbenicima okoliša. Neke kemijske komponente kao što su flavonoidi, polifenoli, terpeni i eterična ulja su prisutna u različitim vrstama biljke *Salvia*. Eterična ulja imaju snažno antioksidacijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. U usporedbi s drugim vrstama biljke *Salvia*, utvrđeno je da *Salvia officinalis* ima najveću količinu eteričnog ulja (Hamidpour i sur., 2014).

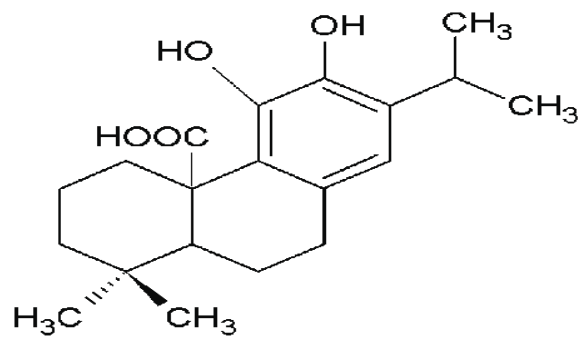
a)



b)



c)



Slika 2. Najvažnije bioaktivne komponente u sastavu kadulje: a) ružmarinska, b) kafeinska i c) karnozinska kiselina (Petrović i sur., 2010)

2.4. Inkapsulacija

Inkapsulacija se može definirati kao postupak uvlačenja jedne tvari (aktivnog sredstva) u drugu tvar (materijal zida). Inkapsulirana tvar, osim aktivnog sredstva, se može nazvati jezgrom, punjenjem, aktivnom, unutarnjom fazom. Tvar koja se inkapsulira često se naziva premazom, membranom, ljuskom, kapsulom, materijalom nosača, vanjskom fazom ili matriksom. Inkapsulacija određene komponente je postignuta kada aktivna čvrsta tvar, tekućina ili plin je zatvorena u matriks ili polimerni sustav kako bi se zaštitila bioaktivna komponenta. Bilo koji materijal koji se može zaštititi, izolirati ili se sporo otpustiti se može inkapsulirati. U prehrambenoj industriji to su: lipidi, enzimi, mikroorganizmi, umjetni zaslađivači, vitamini, minerali, voda, bojila i soli (Risch i Reineccius, 1995). Metoda inkapsulacije stvara barijere između osjetljivih bioaktivnih materijala i okoliša, a time omogućuje diferencijaciju okusa i arome, prekriva loš okus ili miris, stabilizira sastojke hrane i povećava njihovu bioraspoloživost. Jedan od najvažnijih razloga inkapsulacije je manje isparavanje i razgradnja hlapljive aktivne tvari, poput arome. Nadalje, inkapsulacija također sprječava reakciju bioaktivne tvari s drugim komponentama prehrambenih proizvoda kao što su kisik ili voda. Dostupne su brojne metode za inkapsulaciju prehrambenih spojeva. Prvi korak inkapsulacije sastoji se od miješanja bioaktivnog materijala s materijalom za inkapsulaciju, čime se stvara emulzija. Smjesa se može napraviti s jednom ili više komponenti. Smjesa se zatim suši, proizvodeći mikrosfere različitih promjera i oblika, ovisno o metodi pripreme i korištenim materijalima. Za inkapsulaciju je razvijeno nekoliko metoda: fizikalno-kemijske metode (jednostavna ili složena koacervacija i liposomsko zamatanje), fizikalne metode (sušenje raspršivanjem, raspršivanje hlađenjem, raspršivanje sprejom, ekstruzija i liofilizacija) i kemijske metode (polimerizacija na površini i molekularna inkluzija) (Rodrigues do Amaral i sur., 2019).

Budući da su smjese za inkapsuliranje vrlo često u tekućem obliku, mnoge se metode temelje na sušenju. Sušenje raspršivanjem je inkapsulacijska metoda koja se najviše koristi u prehrambenoj industriji jer je fleksibilna, kontinuirana, ekonomična i proizvodi čestice dobre kvalitete. Većina mikrosfera je sušeno raspršivanjem, a ostali se pripremaju hlađenjem raspršivanjem, smrzavanjem, ekstruzijom rastopine i ubrizgavanjem rastopine. Metode istiskivanja sastoje se od kapanja kapljica vodene otopine polimera i aktivne tvari u gelirajuću kupku. Pribor za kapanje može biti pipeta, štrcaljka, vibrirajuća mlaznica, mlaznica za prskanje, rezač mlaza ili atomizirani disk. Sljedeća često korištena metoda je emulgiranje. Koristi se u slučaju aktivnih sredstava koji se topivi u vodi, a postoje dvije kombinacije emulzija: emulzije voda / ulje ili emulzije ulje / voda i dvostruke emulzije voda / ulje / voda. Hlađenje

raspršivanjem ili hlađenje sprejevima metode su za proizvodnju aktivnih sredstava obloženih lipidima. Razlika između ove dvije metode je talište lipida. U slučaju hlađenja sprejevima je to u rasponu od 34-42 °C, a za hlađenje raspršivanjem temperatura je viša. Premazivanje u tekućem sloju je metoda inkapsulacije gdje se premaz nanosi na čestice praha u šaržnom procesoru. Čestice praha suspendiraju se zračnom strujom na određenoj temperaturi i raspršuju raspršenim materijalom za oblaganje. Sušenje vakuumom i sušenje smrzavanjem vrlo su slični postupci sušenja, ali vakuumsko sušenje je brže i jeftinije jer djeluje na temperaturi iznad točke smrzavanja otapala (Rodrigues do Amaral i sur., 2019).

Također kao metode postoje i molekularno uključivanje u ciklodekstrine i liposomske mjehuriće, ali ove su metode skuplje i stoga se manje koriste (Nedović i sur., 2011). Mnogi fenoli i antocijani su osjetljivi i raspadaju se tijekom skladištenja zbog utjecaja okolišnih čimbenika kao što su temperatura i svjetlost (Ersus i Yurdagel, 2007). Antocijani se često raspadnu u druge razgradne produkte tijekom skladištenja ili tijekom djelovanja topline, te se zato koristi mikroinkapsulacija, vrlo pogodna metoda koja će stabilizirati te bioaktivne sastojke od negativnih faktora i uvjeta tijekom skladištenja (Sivamaruthi i sur., 2016).

Nanosfere u prehrambenoj industriji su vrlo bitne za inkapsulaciju nutrijenata, probiotika, antoksidansa i različitih pojačivača okusa. Bocanegra i sur (2005) su stvorili emulziju voda – ulje iz kaka a sa vodenom fazom uz pomoć metode elektroraspršivanja i navedena metoda se pokazala vrlo efikasnom metodom za inkapsulaciju sastojaka različitih prehrambenih proizvoda s određenim udjelom vode kao što su okusi, enzimi, soli, minerali i vitamini koji se odlikuju visokim monodisperzitetom (Desai i Park, 2005).

2.4.1. Materijali za inkapsulaciju

Materijali koji se koriste za izgled zaštitne ovojnice kapsula moraju biti biorazgradivi i sposobni stvarati barijeru između unutarnje faze i okoline. Najvažniji kriteriji za odabir materijala za inkapsulaciju su funkcionalnost koju bi inkapsulacija trebala pružiti konačnom proizvodu, koncentracija mikrosfera, vrsta ispuštanja, zahtjevi za stabilnošću i ograničenja troškova. Materijali koji se koriste za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji moraju pružiti maksimalnu zaštitu bioaktivne komponente protiv okolišnih uvjeta, zadržati aktivne tvari u strukturi mikrosfera tijekom obrade ili skladištenja pod različitim uvjetima, ne reagirati s inkapsuliranim materijalom, imati dobre reološke karakteristike u visokoj koncentraciji ako je to potrebno i

da imaju laku radnu sposobnost tijekom inkapsulacije. Polimeri koji se najčešće koriste u mikroinkapsulaciji su sredstva za inkapsuliranje (Paz i Fredes, 2015). Među svim materijalima, za primjenu metode inkapsulacije u prehrambenoj industriji najčešće se koriste polisaharidi. Škrob i njihovi derivati - amiloza, amilopektin, dekstrini, maltodekstrini, sirupi i celuloza i njihovi derivati također se često koriste. Škrob je prirodni i biorazgradivi polimer dobiven iz različitog povrća koji se sastoji od jednostavnijih komponenata (amiloze i amilopektina). Škrob ima široku primjenu kod stvaranja mikro – i nanočestica za proizvodnju lijekova i drugih prirodnih komponenata. Ekstrakti biljaka - guma Arabica, pektini i topivi polisaharidi soje se također koriste, a koriste se i morski ekstrakti poput karagenana i alginata. Također se koriste mikrobn i životinjski polisaharidi poput dekstrana, kitozana i ksantana. Kitozan je polimer hitina koji ima široku upotrebu kod proizvodnje mikrosfera i nanosfera. Hitin se može naći kod morskih organizama (ljuštura kozice). Kitozan je naširoko korišten i služi kao baza kod stvaranja čestica za inkapsulaciju različitih komponenata. Prehrambena ulja su također tvari koji se mogu inkapsulirati za upotrebu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Ulje kurkume ima antibakterijska, antifungalna i antioksidacijska svojstva, ali je dosta nestabilno pa se zato inkapsulira membranom koji se sastoji od kitozana i alginata, tvoreći polimerne čestice veličine nanometra. Alginat je polisaharid koji se dobiva iz morskih algi, a služi za stvaranje mikročestica i nanočestica za inkapsulaciju raznih komponenata. Želatina i agar su polisaharidi s kompleksnom strukturom, bezbojni su i sadržavaju aminokiseline. Želatina se dobiva iz životinjskog tkiva, agar – agar iz biljaka. Osim prirodnih i modificiranih polisaharida, proteini i lipidi također su prikladni za inkapsulaciju. Primjeri najčešćih proteina mlijeka i sirutke su kazeini, želatina i gluten. Među lipidnim materijalima pogodnim za korištenje kod inkapsulacije u prehrambenoj industriji su masne kiseline i masni alkoholi, voskovi (pčelinji vosak i karnauba vosak), gliceridi i fosfolipidi (Hernandez-Tapia i sur., 2015). Gluten, polimer dobiven iz dva proteina, glijadina i glutenina se koristi za proizvodnju biogoriva te su napravljene nanosfere od pšeničnog glutena deaminiranog sa sukcinom kiselinom za inkapsulaciju ribljeg ulja (Liao i sur., 2011).

2.4.2. Metode inkapsulacije

Većina inkapsuliranih spojeva se nalazi u tekućem obliku te se zato puno metoda inkapsulacije temelji na sušenju, no postoji širok spektar inkapsulacijskih metoda i primijenjuju se u različitim industrijama. U nastavku su opisane neke od najčešće korištenih metoda inkapsulacije.

2.4.2.1. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem (*Spray-drying*) fizikalna je metoda koja se koristi za dobivanje suhog praha iz tekućine njenim naglim sušenjem s vrućim plinom i vrlo je često korištena metoda u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Kod te metode, suspenzija otopine se atomizira i formirane kapljice dolaze u kontakt s vrućim plinom. Tada otapalo u kapljici evaporira ostavljajući produkt u obliku suhog praha. Plin koji se obično koristi je zrak ili rjeđe inertni plin kao dušik. Početna tekućina koja napaja raspršivač može biti otopina, emulzija ili suspenzija. Osim što je postupak inkapsulacije, sušenje raspršivanjem također je i postupak dehidracije i koristi se u pripremi suhih materijala kao što je mlijeko u prahu. Kako bi se pripremili materijali za sušenje raspršivanjem, nosač ili zidni materijal (sladni dekstrin, modificirani škrob ili guma) se hidratiziraju. Okus ili sastojak koji treba inkapsulirati dodaje se u nosač i homogenizira u sustav. Smjesa se homogenizira kako bi se stvorile male kapljice okusa ili sastojka unutar otopine nosača. Smjesa jezgre/zida ulazi u sušilicu za raspršivanje gdje se raspršuje kroz mlaznicu ili kotač. Vrući zrak koji teče u smjeru istodobne struje ili u smjeru protustruje kontaktira atomizirane čestice i isparava vodu, stvarajući suhu česticu koja sadrži male kapljice okusa ili jezgre. Osušene čestice zatim padaju na dno sušilice i sakupljaju se. Materijal jezgre i predviđena primjena važni su za odabir odgovarajućeg materijala za zidove i za optimizaciju uvjeta sušenja. Postupak sušenja raspršivanjem uključuje uspostavljanje radnih uvjeta koji povećavaju uporabu proizvoda i proizvodnju krajnjih proizvoda visoke kvalitete. Oporavak proizvoda uglavnom određuje učinkovitost sakupljanja praha. Gubitak materijala u sustavu sušenja raspršivanjem uglavnom je posljedica pričvršćivanja raspršenih kapljica i suhog praha na stijenku sušilice. Prednosti metode sušenja raspršivanjem su niski troškovi obrade i lako dostupna oprema. Općenito, navedena metoda pruža dobru zaštitu temeljnom materijalu i na raspolaganju je široka paleta zidnih materijala (Poornima i Sinthya, 2017.).

Proces sušenja raspršivanjem odvija se u nekoliko faza: priprema otopine, atomizacija, sušenje te odvajanje produkata od plina za što se najčešće upotrebljavaju cikloni. Atomizacija koji je i najvažniji proces ove metode, može se definirati kao proces formiranja sitnih kapljica isparavanjem otopine. Atomizacija pritiskom kroz mlaznicu (*pressure nozzle atomization*) je jedna od često korištenih atomizacijskih tehnika koja je ujedno i energetski najisplativija te ima najuži raspon između veličine čestica, a atomizacija se događa djelovanjem tlaka tj. potiskivanjem otopine kroz mlaznicu uređaja (Engmann, 2012).

Neki od važnih parametara ove metode su:

- Ulazna temperatura zraka

Što je viša temperatura ulaznog zraka, brža je evaporacije vlage, ali je prašak izložen višim temperaturama, što može narušiti fizikalna i kemijska svojstva proizvoda.

- Izlazna temperatura zraka koja određuje završni stupanj vlažnosti praha

Što je viša temperatura izlaznog zraka, veća će biti i oprema za oporavak praška.

- Viskoznost

Visoka vrijednost viskoznosti otežavajući je faktor pravilnom oblikovanju kapljica, a što je niža viskoznost, to je i niži tlak potreban za oblikovanje pravilnog i kontinuiranog oblika kapljica.

- Čvrsti sadržaj

Potreban je veliki oprez s opterećenjem sustava čvrstim sadržajem (iznad 30%) kako bi se osigurala ispravna atomizacija i kako bi se osiguralo pravilno formiranje kapljica.

- Površinska napetost

Površinska napetost može se značajno smanjiti dodatkom male količine surfaktanta što može rezultirati većom veličinom kapljica i većom brzinom kapljica.

- Temperatura otopine

Ako se otopine prethodno zagrije, tekućina se može lako osušiti jer je donijelo više energije sustavu.

- Volatilitnost tekućine

Visoka volatilitnost je poželjna u svakom procesu sušenja. Nažalost, mogućnosti su dosta limitirane pa se najčešće kao odabir otapala koristi voda.

Prednosti sušenja raspršivanjem su te da ima veliku preciznost i kontrolu nad :

- Veličinom čestica, nasipnoj gustoći, stupnju kristaliziranih i preostalih otapala
- Tipičnoj aplikaciji u unaprijed formuliranim proizvodima
- Mikroinkapsulaciji krutih čestica
- Poboljšanju bioraspoloživosti, poboljšana stabiliziranost proizvoda
- S proizvodima s neobičnim ili otežavajućim karakteristikama
- S ljepljivim ili hidroskopskim proizvodima
- Sa sporo kristalizirajućim proizvodima

- S proizvodima koji se teško mogu izolirati
- Omogućavaju brzo sušenje za materijale koji su osjetljivi na visoke temperature

U farmaceutskoj industriji neki se spojevi nalaze u kristalnom obliku što otežava njihovu upotrebu jer kristalne tvari se ne otapaju lako u vodi i sporo se apsorbiraju te se trenutno ne koriste zbog bioraspoloživosti. Sušila za raspršivanje suše komponentu nakon što se razložila u vodi radi lakše apsorpcije. Razni lijekovi koji se nalaze u kristalnom obliku ne bi se mogli koristiti za ljudsku konzumaciju tako da ih sušila za raspršivanje čine dostupnijima i pogodnijim za upotrebu. Metoda sušenja raspršivanjem također ima komercijalne i medicinske prednosti s inkapsulacijom jer pridonose česticama mogućnosti oko kontroliranog ravnomjernog otpuštanja (kao primjer je šestosatna ili dvanaestosatna alergija, glavobolja). Ovdje se radi o tome da se bioaktivna tvar podvrgne sušenju raspršivanjem i komprimira u mikrosferu. Produljeno otpuštanje antibiotika dopušta smanjenje doziranja ili koncentracije i može biti korisna kod liječenja kroničnih bolesti. Kod prehrambenih proizvoda brzi proces sušenja raspršivanjem svede gubitak okusa nekih tvari na minimum. Mliječni proizvodi kao što su mlijeko, sir i maslac su česti proizvodi koji su napravljeni korištenjem metode sušenja raspršivanjem. Instant kava i instant juhe se također mogu podvrgnuti sušenju raspršivanjem i hrana koja je prethodno sušena raspršivanjem se često konzumira kao dječja hrana. Sušenje raspršivanjem održava maloprodajnu cijenu takve hrane niskom jer navedeni postupak produljuje rok trajanja proizvoda. Sušila za raspršivanje također imaju velike prednosti u industrijama gdje se koriste farbe za bojanje odjeće i pigmenti koji su sušeni raspršivanjem se pojavljuju u mnogim farbama za zidove. Sušila za raspršivanje smanjuju veličine čestica u bojama kako bi se postigla bolja i kontinuirana disperzija. Također se isti proces koristi kod boja koje se tope u tekućinama koje boje odjeću i kod mnogih keramičkih ploča koji se sastoje od čestica koje su bile sušene raspršivanjem te se također stupanj vlažnosti u keramičkim i glinenim pločicama lakše kontrolira kada su proizvedeni sa sušilom za raspršivanje. Metoda sušenja raspršivanjem se također koristi kod proizvodnje mlijeka u prahu. Tijekom procesa proizvodnje mliječnog praha, nakon hlađenja, pasterizacije i faza homogenizacije, mliječna emulzija se koncentrira na 48 – 52% čvrste tvari u sustavu isparavanja s višestrukim učinkom i nakon toga je koncentrirana emulzija spremna za sušenje raspršivanjem (Afoakwah i sur., 2012).

2.4.2.2. Elektoraspršivanje

Elektoraspršivanje je jedna od novijih metoda koja se koristi u nanotehnologiji i mikrobiologiji hrane. Navedena tehnologija se temelji na stvaranju sfera iz polimernih tekućina koristeći visoko električno polje i time stvarajući inkapsulaciju različitih prehrambenih tvari. Navedena tehnologija je vrlo povoljna za okoliš i za ljudsku upotrebu.

- Metoda nanoprecipitacije

Navedena metoda se temelji na sintezi nanosfera iz otapala (organske faze) i faze koja se ne otapa. Princip se temelji na miješanju organske i neorganske faze kako bi se stvorila koloidna suspenzija i to se postiže manipulacijom različitih parametara kao što je protok faze koja se ne otapa i koristeći manju veličinu čestica.

- Metoda emulzije – difuzije

Navedena metoda ima tri faze: organsku, vodenu i difuzijsku fazu. Metoda se temelji na stvaranju emulzije s organskim i vodenim fazama i to miješajući polimer, surfaktant i saturirano otapalo.

- Metoda duplog emulgiranja

Navedena metoda se sastoji od sustava od nekoliko emulgacija, emulgacije ulje – voda – ulje i emulgacije voda – ulje – voda. Metoda se odvija u dva koraka koristeći dva surfaktanta, hidrofobnog surfaktanta koji se koristi za stabilizaciju površine voda – ulje i drugog surfaktanta koji stabilizira površinu vanjskog sloja voda – ulje – voda.

- Emulzijsko-koacervacijska metoda

Navedena metoda se koristi za stvaranje nanosfera prirodnih i sintetskih polimera. Metoda uključuje stvaranje emulzije voda – ulje s organskom fazom (ulje, aktivna tvar) i vodenom faze (voda, polimer) i to mehaničkim miješanjem.

- Metoda polimernog premazivanja

Metoda se temelji na stvaranju tankog premaza na površinu dobivenih nanosfera.

- Slojevita metoda

Temelji se na stvaranju nekoliko polimernih slojeva kako bi se stvorile nanosfere gdje se slojevi sastoje od različitih materijala i time su različite kemijske prirode.

Primjena metode elektroraspršivanja u prehrambenoj industriji

Prvenstveno se metoda elektroraspršivanja koristila u farmaceutskoj industriji, a danas ima i široku primjenu u prehrambenoj industriji. Metoda elektroraspršivanja se također koristi u industriji proizvodnje čokolade kako bi se poboljšala kvaliteta proizvoda. Gorty i Barringer (2011) primijenili su navedenu metodu u čokoladi te metoda elektroraspršivanja smanjuje gubitke što rezultira i održavanjem manje cijene krajnjeg proizvoda. Jestivi filmovi i premazi su također jedna primjena za očuvanje hrane, kao i voskovi na voću kako bi se spriječio gubitak vlage i zadržala sjajna površina radi bolje estetike proizvoda. Za stvaranje jestivih filmova i premaza se najčešće koriste polisaharidi, proteini i lipidi. Budući da elektroraspršivanje kao metoda daje izvrsne krajnje rezultate, moguća je u budućnosti široka primjena navedene metode u agronomiji hrane za stvaranje mikro-i nanočestica za stvaranje gnojiva i kontroliranje otpuštanje agrokemikalija (Tapia-Hernandez i sur., 2015). Elektroraspršivanje kao metoda je vrlo povoljna, ne nastaju nikakvi toksični nusprodukti, stvara biorazgradive čestice i vrlo je jednostavna i jeftina metoda (Bock i sur., 2011).

2.4.2.3. Elektropredenje

Elektropredenje je i dalje najatraktivnija metoda za stvaranje nanovlakana koristeći različite polimerne materijale. Elektropredenje ima prednosti u usporedbi s drugim metodama, naročito za izradu nanovlakana kod odabira materijala i nadzora nad procesom jer kao metoda se smatra fleksibilnijom od ostalih metoda. Elektropredenjem se dobivaju finija vlakna s poželjnim karakteristikama kao što je velika površina u odnosu na volumen i poroznost. Navedene karakteristike čine materijale dobivene elektropredenjem poželjnijim za upotrebu u biomedicinske svrhe uključujući obloge za rane, formiranje skele za uzgoj tkiva i isporuku lijekova. Prirodni i sintetski polimeri mogu se podvrgnuti metodi elektropredenja. Naročito je posljednjih godina rašireno elektropredenje sintetskih polimera. Kod liječenja, mnoge fitokemikalije imaju antimikrobnu aktivnost, kao što su fenoli, terpenoidi i alkaloidi. Sam proces elektropredenja se zasniva na jednostavnom principu, a osim što je sama metoda jednostavna, također nije ni skupa. Aparatura za elektropredenje se sastoji od šprice s mlaznicom, sustavom napajanja i kolektorom koja je najčešće metalni tanjur (Moghadam i sur., 2017). Ova metoda korištenja biljnih produkata se pokazala kao vrlo povoljna metoda i njezine prednosti su: stabilnost, kontrolirano otpuštanje i optimizacija koncentracije.

Usprkos tome što je metoda jednostavna, postoje mnogi parametri koji utječu na karakteristike krajnjih produkata kao što su: gustoća, poroznost i mehanička čvrstoća. Česti parametri koji su povezani s karakteristikama nanovlakana uključuju koncentraciju otapala,

napon, udaljenost od vrha do kolektora, sastav kolektora i geometrija, molekularna težina i viskoznost polimerne tekućine. Parametri kao što su temperatura, vlažnost i protok zraka također imaju bitnu ulogu u određivanju morfologije krajnje strukture. Elektropredenje je fleksibilna metoda te se ova metoda može primijeniti na biljne ekstrakte ili u procesu ukomponirati biljne ekstrakte s drugim sintetskim ili prirodnim polimerima. Glavni princip za polimernu tekućinu je da bi se mogao podvrgnuti elektropredanju je da ima mogućnost nošenja električnog naboja i da ima određeni viskozitet kako bi se mogla rastegnuti bez da se razbije u kapljice. Do danas više od 200 različitih materijala kao što su prirodni polimeri i sintetički polimeri se mogu koristiti u elektropredanju. Zbog svoje praktičnosti, fleksibilnosti, kemijske i fizikalne stabilnosti za elektropredenje povoljniji su prirodni polimeri od sintetičkih. Najpopularniji prirodni polimeri su kitozan, kolagen, želatina, hitin i fibrinogen (Luzio i sur., 2014)

Postoje nekoliko vrsta elektropredenja, a to su:

- Elektropredenje rastopine

Elektropredenje rastopine je korisna metoda kojom se mogu suzbiti neke nepovoljne karakteristike konvencionalnog elektropredenja naročito što se tiče okoliša. Generalno, elektropredenje rastopine je slično konvencionalnom elektropredanju uz dodatak topljenja.

- Elektropredenje bez igala

U novije vrijeme, stvorena je nova metoda elektropredenja koja ima veliki kapacitet za stvaranje nanovlakana. Strategija navedene metode se temelji na istodobnom stvaranju mlazova s otvorene tekuće površine bez utjecaja kapilarnog efekta koji je obično povezan s mlaznicama poput igle. U navedenoj metodi elektropredenja, produktivnost i stvaranje morfologije nanovlakana je ovisna o generatoru vlakana. Ovisno o primijenjenim metodama za iniciranje procesa, metoda se može dijeliti na rotirajuću ili stacionarno elektropredenje.

- Elektropredenje s više rupa

U usporedbi sa konvencionalnim elektropredanjem sustav s više rupa generira ujednačenije električno polje što označava i stvaranje finijih vlakana.

- Elektropuhivanje

Elektropuhivanje je proces elektropredenja u prisutnosti kontroliranog strujanja zraka. U ovom procesu se primjenjuju dvije sile za stvaranje vlakana, i to najčešće električna sila i sila

prisilnog strujanja zraka. Ova metoda se najčešće koristi za otapala gdje nije dovoljno koristiti visoki napon kako bi se nadvladala napetost površine.

- Centrifugalno elektropredenje

Ova metoda koristi kombinaciju električnog i centrifugalnog polja. Zbog takvog principa rada dolazi do stvaranja više vlakana na manjem naponu i sporijoj rotirajućoj brzini.

- Elektropredenje u blizini polja

Navedena metoda je potencijalno lakša metoda za kontrolu mjesta za taloženje vlakana koje je nemoguće postići konvencionalnim elektropredenjem zbog vlakana.

- Koaksijalno elektropredenje

Koaksijalno elektropredenje je inovativna inačica elektropredenja koja koristi dvije koncentrično postavljene kapilare kako bi se stvorila vlakna s jezgrastom školjkastom strukturom. Koaksijalno elektropredenje je naročito zanimljivo za one materijale koji ne mogu samostalno stvarati vlakna elektropredenjem kao što su konduktivni polimeri, metali ili neki prirodni polimeri.

- Elektropredenje emulzijom

Elektropredenje emulzijom je jednostavna metoda za stvaranje nanovlakana s jezgrastom školjkastom strukturom. Sam proces je sličan konvencionalnom elektropredenju uz izuzetak toga da je tekućina zamijenjena emulzijom sa emulzijom primjera "voda u ulju" ili "ulje u vodi" i dopušta inkapsulaciju širokog spektra bioaktivnih molekula (Moghadam i sur., 2017).

Antimikrobni potencijal biljaka se može koristiti u prehrambenoj tehnologiji za povećanje duljine skladištenja proizvoda i za očuvanje kvalitete hrane. Jos jedan biljni ekstrakt koji je uspješno podvrgnut elektropredenju je biljka zelenog čaja koja je poznata po svom antibakterijskom i antioksidativnom djelovanju. Prirodni potencijal biljke zelenog čaja je uspješno ukomponiran u kitozan /polietilen oksidu kako bi se napravio antibakterijski premaz za rane. Elektropredenje je relativno nova metoda koja ima širok spektar mogućnosti za ukomponiranje biljnih produkata kao što su esencijalna ulja u neki odgovarajući polimer kako bi se stvorila nanovlaknasta struktura za biomedicinske svrhe (Khan i sur., 2018).

2.4.2.4. Elektrozamrzavanje

Zamrzavanje hrane je vrlo složen proces koji se sastoji od različitih fizikalnih i kemijskih promjena koji mogu utjecati na kvalitetu krajnjeg proizvoda. Metoda elektrozamrzavanja, naročito elektrozamrzavanje potpomognuto električnim poljem je vrlo povoljna metoda jer joj je potreban manji utrošak energije, manja brzina zraka i stvara bolju kvalitetu zadržavanja (Jha i sur. 2018).

Elektrozamrzavanje je metoda koja kombinira sušenje raspršivanjem i liofilizaciju pritom dajući prednosti i jedne i druge metode. Navedena metoda je povoljna za prehrambene tvari koji su osjetljivi na ekstremne temperature tijekom procesiranja i gdje su vrijeme i cijena krajnjih proizvoda bitni uvjeti za proizvodnju. Elektroamrzavanje se koristi u proizvodnji različitih pojačivača okusa te koristi različite proteine, enzime, vitamine u primjeni. Prednosti navedene metode uključuju kraće vrijeme sušenja i poboljšanu rehidraciju (Dutta i sur. 2018).

Sušenje je bitan proces za mnoge industrije, kao što su prehrambena i farmaceutska industrija pri čemu se dobiva krajnji proizvod sa dobrom stabilnošću tijekom skladištenja. Sušenje zamrzavanjem je povoljna metoda za termoosjetljive proizvode koji su podložni termalnoj degradaciji. Navedena metoda se najčešće koristi kod proizvodnje visokokvalitetnih proizvoda zbog visoke cijene procesa proizvodnje. Vrijeme sušenja klasičnog procesa zna trajati nekoliko sati pa sušenje zamrzavanjem kao proces smanjuje vrijeme potrebno za sušenje. Proces atomizira tekućinu kako bi se povećala temperatura i površina prijenosa mase. Sprej se zatim zamrzava u vrlo hladnom plinu ili kriogeničnoj tekućini kako bi se stvorile čvrste čestice koje su zatim podvrgnute sušenju zamrzavanjem (Al-Hakim, 2004).

2.4.2.6. Liofilizacija

Inkapsulacijski sustavi temeljni na lipidima su odlični izbor za inkapsulaciju bioaktivnih molekula u proizvodnji hrane i to naročito za kontroliranje otpuštanje hidrofobnih molekula jer postoje dvije najčešće prepreke za inkapsulaciju hidrofobnih molekula, a to su: poteškoće pri disperziji lipofilnih bioaktivnih formulacija na vodenoj bazi, a drugo je što hidrofobne molekule imaju slabu bioraspoloživost u gastrointestinalnom traktu. Istraživanjem je pokazano da inkapsulacija temeljena na lipidima povećava bioraspoloživost (Parada i Aguilera, 2007). Liofilizacija je najčešće korištena metoda za postizanje promjene faza fosfolipidnih disperzija (Toniazzi i sur., 2017).

Navedena metoda uspješno koristi fenomen sublimacije na prethodno osušeni proizvod te uklanja zaostalu vlagu modulacijom topline. Ovom metodom se stabilizira krajnji proizvod te

time smanjuje cijenu skladištenja i transporta. Princip liofilizacije se sastoji od tri faze: zamrzavanja gdje se prisutna voda u proizvodu zamrzava, primarnog sušenja gdje se voda uklanja iz zamrznute mase procesom liofilizacije i sekundarnog sušenja gdje se zaostala vlaga prisutna u formulaciji uklanja procesom desorpcije (Shivanand i Mukhopadhyaya, 2017).

Prednosti liofilizacije su:

- Dulja stabilnost proizvoda
- Minimalizirana je kemijska dekompozicija
- Uklanjanje vode iz proizvoda bez upotrebe visokih temperatura

Liofilizacija se koristi u farmaceutskoj industriji za proizvodnju lijeka za injekcije i proizvodnju lijekova koji se oralno konzumiraju. S obzirom na željeni krajnji proizvod koriste se različite metode liofilizacije: sušenje kolektora, šaržno sušenje i sušenje u rasutom stanju (Shivanand i Mukhopadhyaya, 2017). Navedena metoda se također koristi u prehrambenoj industriji za očuvanje stabilnosti kave, sladoleda i hrane za astronaute (Deepak i Iqbal, 2015).

2.4.2.7. Koacervacija

Koacervacija je metoda koja se često koristi i metoda je koja uključuje makromolekularne agregate koji tvore koloidni sustav s dvije postojeće faze: jednom koja je bogata koloidima (koacervat) i drugom koja je siromašna koloidima (supernatant). Ova metoda izvodi se taloženjem sredstva za inkapsuliranje oko aktivnog spoja kroz fizikalno-kemijske promjene, poput temperature, polarnosti, pH ili čvrstoće. Koacervacija se događa kada promjene medija uzrokuju da zidni materijal tvori polimerne lančane jedinice, koje zatim stupaju u interakciju s drugim bliskim lancima, formirajući agregate. Nakon ovog koraka agregati međusobno djeluju pomoću sila privlačenja visokog intenziteta. Posljedično, agregirani polimerni lanci taložiti će se oko kapljica hidrofobne faze raspršene u emulziji, tvoreći zaštitni film. Mikrosfere dobivene koacervacijom mogu se klasificirati kao mononuklearne ili multinuklearne prema svojoj unutarnjoj strukturi. Kad se kap jezgrenog materijala inkapsulira koacervacijom, često nastaju mononuklearne mikrosfere. Multinuklearne mikrosfere imaju veće kontrolirano otpuštanje i proizvode se lakše od mononuklearnih mikrosfera. Složena koacervacija koristi se za mikrokapsulaciju osjetljivih mikroorganizama i spojeva, poput omega-3 proizvoda (Rodrigues do Amaral i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Uzorak koji je korišten u ovom istraživanju je osušena i usitnjena kadulja (*Salvia officinalis*) tvrtke Franck d.o.o., Zagreb.

3.1.2. Reagensi

U navedenom istraživanju su upotrijebljeni navedeni reagensi: Folin-Ciocalteu reagens, metanol, natrijev karbonat, natrijev alginat, kalcijev klorid, 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, pufer 0,2 M NaHCO_3 i 0,06 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (pH=8,3).

Sok od jabuke je napravljen od tekućeg koncentrata s vodom i kalibriran na 11,2 °Bx prema nacionalnom propisu iz Pravilnika o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (Pravilnik, 2013).

3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor

Uređaji:

- Büchi inkapsulator (Büchi Encapsulator B-390, Büchi Labortechnik AG, Švicarska)
- Mastersizer 2000 uređaj (Malvern Instruments, Worcestershire, Velika Britanija)
- Orbitalna miješalica (OS-20 BioSan, Ltd., Latvija)
- Analizator vlage (Moisture analyzer – PMB, Adam Equipment, SAD)
- Analitička vaga (Precisa 100A- 300M, Precisa Gravimetrics AG, Švicarska)
- Spektrofotometar (Shimadzu UV/Vis 1700, Shimadzu Suzhou Instruments, Kina)
- Vorteks (Vorteks Genie 2, Blender & Hobein AG, Švicarska)

Stakleno posuđe: kivete, čaše, odmjerne tikvice, menzure, epruvete, lijevak, stakleni štapić, Petrijeve posudice, stakleno posuđe, pipete, pokrovno stakalce.

Ostali pribor: magnetič za miješanje, pinceta, stalak za epruvete, gaza, filter papir, aluminijska folija, plastične kivete (50 mL), automatske pipete.

3.2. Metode rada

3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Ova metoda služi za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani uporabom stabilnog DPPH radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH – H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur, 2001; Prior i sur., 2005).

Postupak određivanja

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakta kadulje te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100%-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbancije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 mL 100% metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca za Trolox

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaže 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μ M na način da se redom otpipetira :100 μ L, 250 μ L, 500 μ L, 1000 μ L, 1250 μ L i 1500 μ L u odmjerne tikvice od 10 mL te se iste do oznake nadopune 100%-tnim metanolom. U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100%-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100%-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Na temelju dobivenih rezultata, jednačba pravca glasi:

$$y = 0,5366 x + 0,002 \quad /1/$$

$$R^2 = 0,9948$$

gdje je :

y=razlika kontrole i apsorbancija uzorka pri 517 nm

x=ekvivalent troloxa (TAE) (μM)

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola (UF)

Određivanje ukupnih fenola (UF) provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 100 μL ekstrakta kadulje, 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se pomiješa, a potom se uzorci termostatiraju 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izračunavanje

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96%-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice se otpipetira 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute se doda 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se termostatiraju 60 minuta na sobnoj temperaturi. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola se izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y=0,009x + 0,0072 \quad /2/$$

gdje je:

Y-apsorbancija pri 765 nm

X-koncentracija galne kiseline (mg/L)

3.2.4. Inkapsulacija

Priprema ekstrakta:

1 g osušenog i usitnjenog uzorka kadulje stavljen je u laboratorijsku čašu i promiješan na magnetskoj miješalici uz 50 mL destilirane vode tijekom 9 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je potrebno ekstrakt profiltriran kroz filter papir i lijevak te pohranjen u plastične kivete.

Priprema mikrosfera:

Mikrosfere su se pripremile pomoću Büchi inkapsulatora (Büchi Encapsulator B-390, nastavak od 0.08 mm)

Prvo se pripremila otopina 1,5% natrijevog alginata u ekstraktu te je takva otopina prolazila kroz inkapsulator i kapala u 1%-tnu otopinu kalcijevog klorida uz konstantno lagano miješanje magnetskom miješalicom gdje su u dodiru s kalcijevim ionima nastajale mikrosfere. Nakon što su se mikrosfere ostavile u otopini kalcijevog klorida još sat vremena uz miješanje kako bi mikrosfere očvrstnule, mikrosfere su se lagano ispirale destiliranom vodom i profiltrirale.

3.2.5. Otpuštanje mikrosfera

Miješanje 20 g mokrih mikrosfera u 50 ml vode/soka ili miješanje 0,5 g suhih mikrosfera u 50 ml vode na magnetskoj miješalici i sva mjerenja su napravljena u duplikatu. U određenim vremenskim intervalima tijekom 30 minuta za mokre mikrosfere i 2/3 h za suhe mikrosfere (jer se sporije otpuštaju) zatim su uzeti alikvoti (tekući dio bez mikrosfera) te su im izmjerene vrijednosti UF i antioksidacijska aktivnost (DPPH).

3.2.6. Određivanje sadržaja vlage u mikrosferama

Sadržaj vlage određen je analizom vlage (Moisture analyzer-PMB, Adam Equipment, USA). Određena masa uzorka (mokrih mikrosfera) stavljena je u uređaj koji je zagrijavao temperaturu na 131 °C kako bi osušio mikrosfere do konstantne mase. Konačna masa uzorka je izvagana i izračunat je sadržaj vlage (%). Mjerenja su ponovljena tri puta.

$$SV(\%) = \frac{m_p - m_z}{m_z} \times 100 \quad /3/$$

3.2.7. Inkapsulacijska učinkovitost

Inkapsulacijska učinkovitost (IU) definira se kao omjer sadržaja ukupnih fenola inkapsuliranih unutar mikrosfera (γ_{INK}) u odnosu na početnu količinu UF u ekstraktu (γ_{UK}). Učinkovitost inkapsulacije (izražena kao postotak ukupnih polifenola koji su stvarno ugrađeni u mikrosfere) izračunana je jednadžbom:

$$IU(\%) = \frac{\gamma_{INK}}{\gamma_{UK}} \times 100 \quad /4/$$

gdje je $\gamma_{INK} = \gamma_{UK} - \gamma_{FILTRAT}$. Mjerenja su ponovljena tri puta.

3.2.8. Određivanje kapaciteta punjenja

Kapacitet punjenja (KP) se definira kao koncentracija napunjenog fenolnog sadržaja u mikrosferi. Sadržaj ukupnih polifenola zarobljenih u dobivenim mikrosferama procijenjen je otapanjem 1 g mokrih mikrosfera u 10 mL pufera 0,2 M NaHCO_3 i 0,06 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pri pH pufera 8,3 mućkanjem na orbitalnoj miješalici (OS-20 BioSan, Ltd., Latvija) na sobnoj temperaturi 60 minuta, koji rade na 160 okretaja /min. Mjerenja su ponovljena tri puta. Prosječni rezultat svih mjerenja predstavljen kao UF 1 g mikrosfere /10ml pretvorio se kao ekvivalent za 20 g/50 ml, što je bio početni omjer mase i volumena za mjerenje oslobađanja bioaktivnih spojeva. Rezultat je izražen u mg GAE/L.

3.2.9. Bubrenje

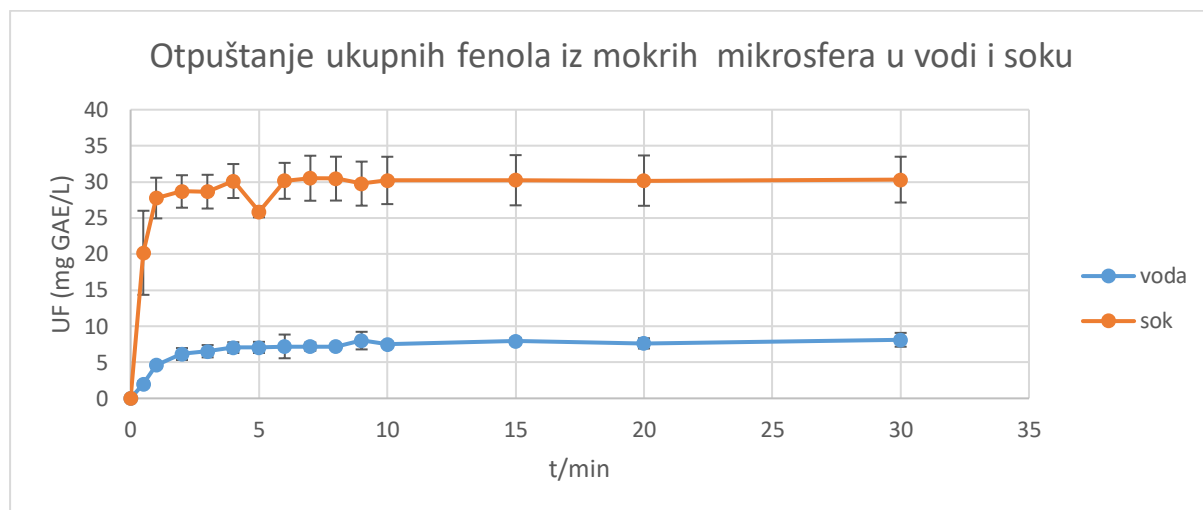
Stupanj bubrenja (SB) određen je na mikrosferama raspršenim u destiliranoj vodi. Suhe mikrosfere (50 mg) su se dispergirale u bočicu s 10ml destilirane vode i ostavile da bubre na sobnoj temperaturi tijekom tri sata. Mokra masa nabubrenih mikrosfera određena je brisanjem filter papirom kako bi se uklonila vlaga koja se priličepila za površinu, a odmah potom su nabubrene mikrosfere izvagane. Stupanj bubrenja se zatim izračunao pomoću jednadžbe:

$$SB(\%) = \frac{w_b - w_0}{w_0} \quad /5/$$

Gdje je w_b težina nabubrenih mikrosfera, a w_0 je njihova početna težina. Mjerenja su ponovljena tri puta.

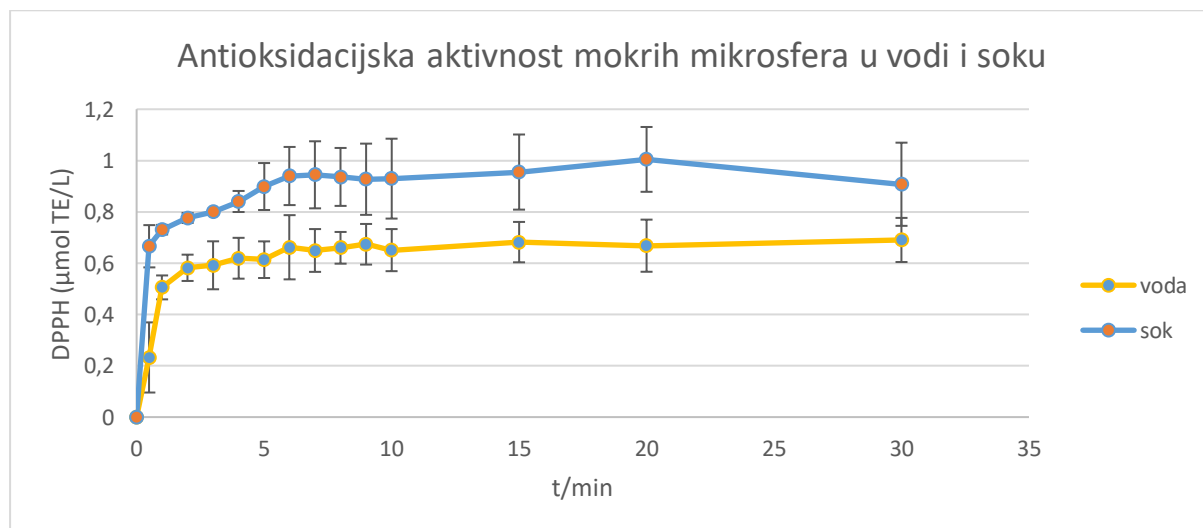
4. REZULTATI I RASPRAVA

Ekperimentalni dio ovog rada prikazuje analizu otpuštanja polifenola i antioksidanasa iz mokrih i osušenih mikrosfera kadulje u soku i vodi te analizu fizikalnih parametara dobivenih mikrosfera. Obrada svih rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel. Na slici 3. prikazan je graf otpuštanja UF iz mokrih mikrosfera u različitim medijima - soku i vodi u vremenskom intervalu od 30 minuta.



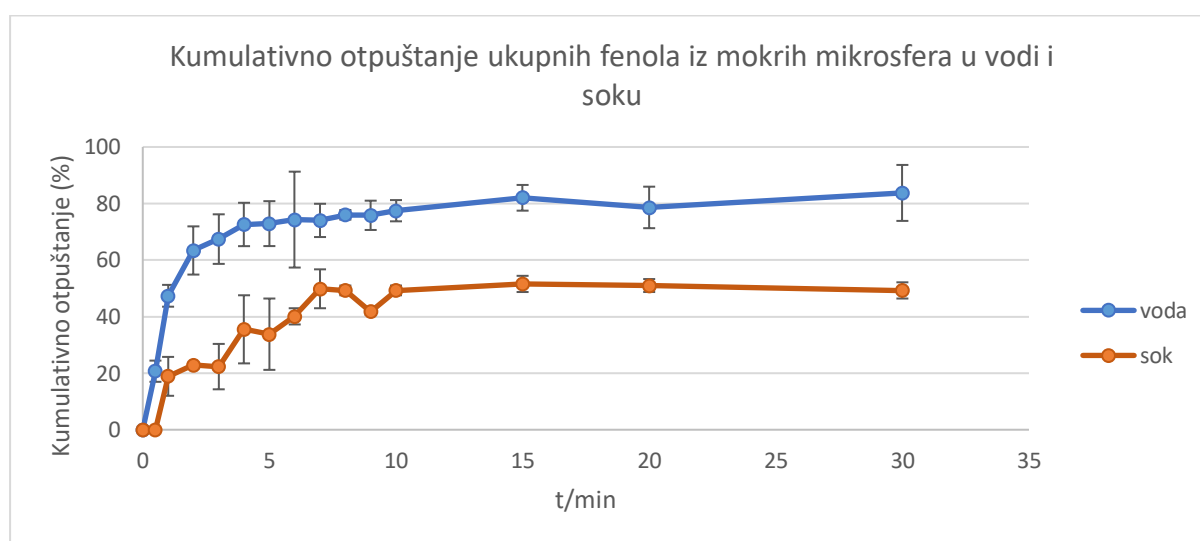
Slika 3. Otpuštanje ukupnih fenola iz mokrih mikrosfera u vodi i soku

Iz slike 3. može se uočiti da su vrijednosti UF puno veće otpuštanjem mikrosfera u soku nego u vodi, što je i očekivano jer sok sadržava prirodne polifenole iz jabuke.



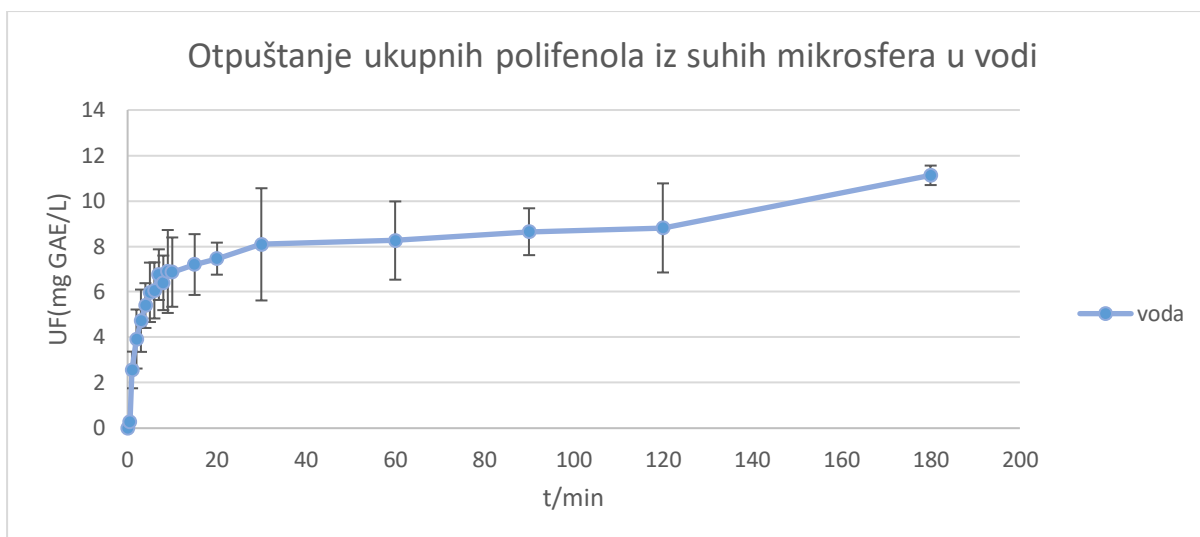
Slika 4. Antioksidacijska aktivnost mokrih mikrosfera u vodi i soku

Na slici 4. prikazana je antioksidacijska aktivnost mokrih mikrosfera u vodi i soku tijekom 30 minuta gdje mikrosfere u soku pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost nego u vodi. Nakon 30 sekundi dolazi do naglog porasta antioksidacijske aktivnosti mokrih mikrosfera u soku te nakon naglog porasta antioksidacijske aktivnosti, dolazi do stabilizacije krivulje u 6. minuti. Kod antioksidacijske aktivnosti mokrih mikrosfera u vodi dolazi do naglog porasta antioksidacijske aktivnosti u 1. minuti te također kao i kod mokrih mikrosfera u soku, dolazi do stabilizacije krivulje u 6. minuti pri čemu je puno veća antioksidacijska aktivnost mokrih mikrosfera u soku.



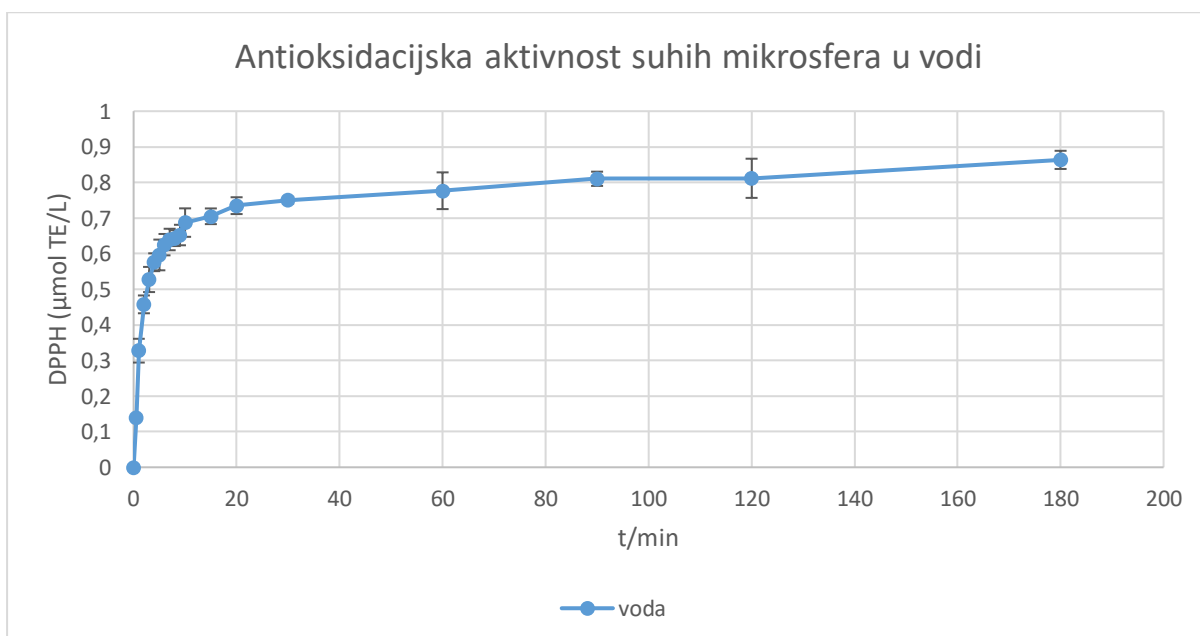
Slika 5. Kumulativno otpuštanje ukupnih fenola iz mokrih mikrosfera u vodi i soku

Na slici 5. praćeno je kumulativno otpuštanje ukupnih polifenola iz mokrih mikrosfera kako bi se moglo predočiti otpuštanje polifenola u postotcima i kako bi se odredilo nakon koliko vremena dolazi do potpunog otpuštanja polifenola. Iz grafa se može uočiti da je puno brže otpuštanje polifenola u soku nego u vodi. U 1. minuti dolazi do naglog otpuštanja polifenola iz mokrih mikrosfera u soku te se otpustilo 47,37 % dok su mokre mikrosfere u vodi u istom vremenskom razdoblju otpustile tek 18,88 % ukupnih polifenola. Otpuštanje polifenola se nakon naglog porasta stabiliziralo u oba medija nakon 10 minuta, ali je i dalje puno veće otpuštanje polifenola u soku. Maksimalno otpuštanje polifenola u soku je postignuto u 30. minuti kada je otpušteno 83,76% ukupnih polifenola, a u vodi se najviše polifenola otpustilo u 15. minuti kada je otpušteno 51,57 % ukupnih polifenola iz mokrih mikrosfera. Iz grafa se također može uočiti da je u vremenskom razdoblju od 30 minuta došlo do stabilizacije i jedne i druge krivulje.



Slika 6. Otpuštanje ukupnih polifenola iz suhih mikrosfera u vodi

Na slici 6. prikazano je otpuštanje ukupnih polifenola iz osušenih mikrosfera u vodi. Iz grafa se može vidjeti da se koncentracija otpuštenih polifenola u vodi naglo povećavala do 20. minute kada je koncentracija iznosila 7,46 mg GAE/L te je nakon toga došlo do postepene stabilizacije. Također je vidljivo da se koncentracija otpuštenih polifenola nije stabilizirala nakon 30 minuta i da je suhim mikrosferama potrebno duže vremena za otpuštanje u odnosu na mokre mikrosfere. Najveća koncentracija otpuštenih polifenola vidljiva je nakon 180 minuta kada je koncentracija otpuštenih polifenola iznosila 11,13 mg GAE/L.



Slika 7. Antioksidacijska aktivnost suhih mikrosfera u vodi

Slika 7. prikazuje antioksidacijsku aktivnost suhih mikrosfera u vodi pri čemu se mogu potvrditi vrijednosti iz prethodnog grafa gdje se vidi da je nagli porast antioksidacijske aktivnosti u 10. minuti kada je koncentracija otpuštenih ukupnih polifenola u vodi bila 7,46 mg GAE/L te je nakon toga došlo do postepene stabilizacije krivulje ali pri tome je najveća antioksidacijska aktivnost bila nakon 180 minuta što se također može potkrijepiti prethodnim grafom kada je i bila najveća koncentracija otpuštenih polifenola u vodi (11,13 mg GAE/L).

Iz navedenih rezultata se može zaključiti da se otpuštanje polifenola događa u dvije faze. Prva faza otpuštanja polifenola koju označava nagli porast koncentracije polifenola u soku i vodi se događa zbog naglog otpuštanja polifenola koji se nalaze na površini omotača od alginata. Nakon ubrzanog otpuštanja polifenola, slijedi sporija faza otpuštanja polifenola koji se događa zbog difuzije jer propusnost gela alginata omogućava difuzijsko otpuštanje polifenola tijekom dužeg vremenskog razdoblja (Belščak-Cvitanović, 2011).

Tablica 1. Fizikalni parametri kapsula s ekstraktom kadulje

Fizikalni parametri	Rezultati
Kapacitet punjenja (mg GAE/L)	9,69
Inkapsulacijska učinkovitost (%)	88,44
Udio vlage (%)	97,49 ± 0,22
Stupanj bubrenja (%)	56,90 ± 16,26

U tablici 1. prikazani su fizikalni parametri mikrosfera ekstrakta kadulje. Kapacitet punjenja označava maksimalnu koncentraciju polifenola u mokrim mikrosferama ekstrakta kadulje koja iznosi 9,69 mg GAE/L. Udio vlage u mokrim mikrosferama je 97,49 % što označava da je jako malo suhe tvari prisutno i da prevladava vodeni medij u mikrosferama. Za vrijeme otpuštanja polifenola dolazi i do bubrenja čestica mikrosfere zbog hidratacije hidrofilnih skupina alginata te je tada sporije otpuštanje polifenola (Pasparakis i Bouropoulos, 2006). Stupanj bubrenja iznosi 56,90 ± 16,26 %. Učinkovitost inkapsulacije iznosi 88,44 % te se može zaključiti da je 11,56 % ukupnih polifenola izgubljeno u filtratu te se može iz navedenih rezultata zaključiti da je metoda inkapsulacije visoko učinkovita metoda.

5. ZAKLJUČAK

Sve je veća potreba u industrijama za novijim inovativnim metodama proizvodnje koje bi mogle poboljšati svojstva krajnjih proizvoda, a pritom moraju biti efikasne, brze i jeftine. Iz rezultata eksperimentalnog dijela ovog rada utvrđeno je da su mikrosfere imale visoku učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola iz ekstrakta kadulje (88,44 %).

Eksperimentalnim dijelom ovog rada ustanovljeno je da mokre mikrosfere puno brže otpuštaju polifenole u vodi i soku nego osušene mikrosfere. Mokre mikrosfere su već nakon 5 minuta otpustile većinu polifenola te bi zato mogle imati primjenu u prehrambenoj industriji kod pripreme funkcionalnih napitaka i instant prahova gdje je poželjno brzo otpuštanje bioaktivnih tvari (mlijeko u prahu, instant čokoladni napitci, instant povrtne juhe, instant čajevi i energetska pića).

Zbog sporog otpuštanja polifenola iz suhih mikrosfera, što je potvrđeno eksperimentalnim rezultatom (najveća koncentracija otpuštenih polifenola bila je nakon 180 minuta i iznosila je 11,13 mg GAE/L), može se zaključiti da bi osušene mikrosfere svoju primjenu imale u farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji kod proizvodnje različitih krema, gdje je poželjno dugotrajnije otpuštanje bioaktivnih tvari kako bi se produžilo zaštitno djelovanje danog proizvoda. Suhe mikrosfere bi se također mogle primijeniti kod proizvodnje različitih lijekova kada je potrebno da bioaktivne tvari ostaju neko duže vrijeme u organizmu nakon oralne primjene. Zbog svoje široke primjene i velikih mogućnosti, jednostavnosti i efikasnosti, može se očekivati da će inkapsulacija biti sve više primijenjena i u budućnosti.

6. LITERATURA

Afoakwah, A. N., Owusu, J., Adomako, C., Teye, E. (2012) Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global Journal of Biological Sciences & Biotechnology* **1**(2), 132-140.

Al-Hakim, K. (2004) An Investigation of Spray-Freezing and Spray-Freeze-drying. *Trends in Food Science & Technology*. **2**(1), 37-63.

Anonymous 1 (2017) <<https://thegrowers-exchange.com/products/her-sa01>> Pristupljeno 23. kolovoza 2020.

Belščak-Cvitanović A., Stojanović R., Manojlović V., Komes D., Cindrić I. J., Nedović V., Bugarski B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*. **44**(4): 1094-1101.

Ben El Hadj Ali, I., Bahri R., Chaouachi, M., Boussaid, M., Harzallah - Skhiri, F. (2014) Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus*. *Poir. Organs. Industrial Crops and Products* **62**, 188-195.

Bocanegra, R., Galána, D., Márquez B., Loscertales, I. G., Barreroe, A. (2005) Multiple electrosprays emitted from an array of holes. *Aerosol Science* **36**, 1387 – 1399.

Bock N., Woodruff, A. M., Hutmacher, W. D., Dargaville, R. T. (2011) Electrospraying, A Reproducible Method for Production of Polymer Microspheres for Biomedical Applications. *Polymers* **3**, 131-149.

Both, S., Chemat, F. and Strube, J. (2014) Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* **21**(3): 1030-1034.

Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products* **64**(7), 892-895.

Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a Free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* **28**(1), 25-30.

- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., Velić, D. (2011) Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology* **160**, 89-97.
- Cortez, R., Luna-Vital, D., Margulis D, Gonzalez de Mejia, E. (2017) Natural Pigments :Stabilisation Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **16**, 180-198.
- Deepak B., Iqbal Z. (2015) Lyophilization – Process and Optimization for Pharmaceuticals. *International Journal of Drug Regulatory Affairs* **3**(1), 30-40.
- Desai, K. G. H. i Park, H., J. (2005) Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology* **23**(7), 1361-1394.
- Doi N., Jo, J.-I., Tabata, Y. (2012) Preparation of Biodegradable Gelatin Nanospheres with a Narrow Size Distribution for Carrier of Cellular Internalization of Plasmid DNA. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **23**(8), 991-1004.
- Dutta, S., Moses, J. A., Anandharamakrishnan, C. (2018) Modern Frontiers and Applications of Spray-freeze – drying in design of food and biological supplements. *Journal of Food Process Engineering* **41**(8).
- Engmann, N. F. (2012) Spray Drying as an Appropriate Technology for the Food and Pharmaceutical Industries. *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology* **1**(3), 467-476.
- Ersus, S. i Yurdagel, U. (2007) Microencapsulation of Anthocyanin Pigments of Black Carrot (*Daucus carota* L.) by Spray Drier. *Journal of Food Engineering* **80**, 805-812.
- Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C. (2004) Electron -transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH center dot radical in alcoholic solutions. *The Journal of Organic Chemistry* **69**(7), 2309-2314.
- Ghoshal, G. (2018) – Biotechnology in Food Processing and Preservation: An Overview **2**, 27-54.
- Gorty, A. V. i Barringer S. A. (2011) Electrohydrodynamic spraying of chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation* **35**(4), 542-549.

Halliwell, B. (1990) How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Chemistry* **9**(1), 1-32.

Hamidpour, M., Hamidpour, R., Shahlari, M. (2014) Chemistry, Pharmacology and Medicinal Property of Sage (Salvia) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease and Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **4**(2), 82-88.

Hindmarsh, J. P., Russell, A. B., Chen, X. D. (2007) Fundamentals of the Spray Freezing of Foods – Microstructure of Frozen Droplets. *Journal of Food Engineering* **78**(1), 136-150.

Huang, D. J., Ou, B. X., Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(6), 1841-1856.

Jha, K. P., Xanthakis, E., Jury, V., Havet, M., Le-Bail, A. (2018) Advances of Electrofreezing in Food Processing. *Current Opinions in Food Science* **23**, 85-89.

Jimenez, A., Selga, A., Torres, J. U., Julia, L. (2004) Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Organic Letters* **6**(24), 4583-4586.

Jovanović, A., Petrović, P., Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski, B. (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite Sirovine* **37**, 37-42.

Kapcum, C., Uriyapongson, J. (2018) Effects of storage conditions on phytochemical and stability of purple corn cob extract powder. *Food Science and Technology* **38**(1), 301-305.

Khan, A. R., Xiangyang, S., Ahmad, A., Mo, X. (2018) Electrospinning of Crude Plant Extracts for Antibacterial and Wound Healing Applications: A review. *SM Journal of Biomedical Engineering* **4**(1), 1024-1030.

Lakkis M. J. (2016) Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, 2.izd., John Wiley & Sons

Liao, L., Luo, Y., Zhao, M., Wang, Q. (2011) Preparation and characterization of succinic acid deamidated wheat gluten microspheres for encapsulation of fish oil. *Colloids and surfaces : Biointerfaces* **92**, 305-314.

Luzio, A., Canesi, E. V., Bertarelli, C., Caironi, M. (2014) Electrospun Polymer Fibers for Electronic Applications. *Materials* **7**, 906-947.

- Miron, T., Plaza, M., Bahrim, G., Ibanez, E., Herrero, M. (2011) Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A* **1218**(30), 4918-4927.
- Moghadam, M. S., Barbhuiya, S., Guo L., Liu, D., Umer, R., Qi, X., Tang, Y. (2017) Electrospinning: Current Status and Future Trends in Nano-size. *Polymers: Preparation, Properties, Applications*. 1. izd., Springer. str. 89-154.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levica S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedure Food Science* **1**, 1806-1815. Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B., An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Science* **1**, (2011), 1806-1815.
- Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., Kawakami, Y. (1997) Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) *Biochemistry and Molecular Biology International* **42**(2), 361-370.
- Parada, J. i Aguilera J.M. (2007) Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science* **72**(2), 21-32.
- Pasparakis G., Bouropoulos N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics* **323**(1-2):34-42.
- Paz, R., Fredes, C. (2015) The encapsulation of anthocyanins from berry-type fruits. Trends in foods. *Molecules* **20**(4), 5875-5888.
- Petrović, N. V., Zizovic, I., Saicic, S. Ivanović, J., Petrovic, S. (2010) Oxidative stabilization of sunflower oil by antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **16**(4), 287.
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(10), 4290-4302.
- Risch, S. J., Reineccius G. A. (1995) Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients ASC Symposium Series. *ACS Symposium Series* 590.
- Rodrigues do Amaral, P.H., Lopes Andrade, P., Costa de Conto, L., (2018) Microencapsulation and Its Uses in Food Science and Technology: A Review, *Microencapsulation – Processes, Technologies and Industrial Applications* **1**, 1-11.

Shivanand, A., Mukhopadhyay, S. (2017) A review on Lyophilization: A Technique to Improve Stability of Hygroscopic Thermolabile Substances. *Pharma Tutor* **5**(11), 28-39.

Shortle ,E., O ´Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98**(4), 828-834.

Sivamaruthi, B. S., Pengkumsri, N., Saelee, M. Kesika, P., Sirilun, S., Peerajan, S. Chaiyasut, C. (2016) Impact of physical treatments on stability and radical scavenging capacity of anthocyanidins. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **8**(1), 162-167.

Tapia-Hernández, J. A., Torres-Chávez I. P., Ramírez-Wong, B., Rascón-Chu, A., Plascencia-Jatomea, M., Barreras-Urbina, G. C., Rangel-Vázquez N. A., Rodríguez-Félix, F. (2015) Micro- and Nanoparticles by Electrospray: Advances and Applications in Foods. *Journal of Agricultural and food chemistry* **63** (19), 4699–4707.

Toniazzo, T., Peres, M. S., Ramos, A. P., Pinho S. C. (2017) Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physicochemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles. *Food Bioscience* **19**, 17-25.

Vuleta, G., Milić, J., Savić, S. (2012) Farmaceutska tehnologija (Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia .

Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology* **17**(6), 300-312.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Štorkić

ime i prezime studenta