

Inkapsulacija eteričnog ulja sjemenki komorača postupkom elektrostatske ekstruzije

Robić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:440627>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Katarina Robić

**INKAPSULACIJA ETERIČNOG
ULJA SJEMENKI KOMORAČA
POSTUPKOM ELEKTROSTATSKE
EKSTRUZIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maje Repajić te uz pomoć Erike Dobroslavić, mag. nutr.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ PlantBioPower, IP-01-2018-4924). Voditelj projekta: prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac.

ZAHVALA

Prvenstveno se želim zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Repajić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici, nesebičnoj pomoći i prenesenom znanju, uloženom vremenu i razumijevanju. Hvala Vam na svim savjetima, poticaju i vođenju kroz pisanje ne samo ovog već i završnog rada.

Želim se zahvaliti i Eriki Dobrosravić, mag. nutr. na velikoj pomoći, strpljivosti, susretljivosti i savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada, kao i na ugodnoj radnoj atmosferi i dobrom raspoloženju.

Hvala i mojim curkama, na svojoj pomoći, podršci i motivaciji. A najveće hvala na svim predivnim trenutcima i stvorenim uspomenama kroz godine studiranja. Hvala na prijateljstvu, smijehu i šalama uz koje su i najduži studentski dani prolazili brzo.

Želim se zahvaliti i cijeloj svojoj obitelji na strpljenju, podršci i razumijevanju.

Najveće hvala mojim roditeljima i bratu, bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

Mama i tata, hvala vam na neizmjerne i bezuvjetnoj ljubavi, podršci kroz cijeli život i što ste mi omogućili bezbrižno studiranje.

Braco, hvala ti što si vjerovao u mene i uvijek imao prave riječi ohrabrenja, utjehe i motivacije!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

INKAPSULACIJA ETERIČNOG ULJA SJEMENKI KOMORAČA POSTUPKOM ELEKTROSTATSKE EKSTRUZIJE

Katarina Robić, univ. bacc. nutr.
0058206702

Sažetak: U ovom radu ispitan je utjecaj udjela alginata (1; 1,5 i 2 %), proteina sirutke (0; 0,75 i 1,5 %) i načina sušenja (na zraku i liofilizacija) tijekom inkapsulacije eteričnog ulja sjemenki komorača elektrostatskom ekstruzijom. Određivani su iskorištenje, učinkovitost, kapacitet uklapanja, veličina i oblik kapsula te bubrenje kapsula. Iskorištenje je određeno u rasponu od 37,75 do 56,97 %, učinkovitost od 6,16 do 51,95 %, a kapacitet uklapanja od 37,88 do 82,60 %. Prosječna veličina mokrih kapsula bila je 3,17 mm, a suhih 1,99 mm. Faktor sferičnosti mokrih kapsula određen je u rasponu od 0,03 do 0,09, a faktor skupljanja od 0,17 do 0,55. Rehidracijom dolazi do bubrenja kapsula nakon 20 min. Udio alginata značajno utječe na iskorištenje, a sva tri ispitivana parametra značajno utječu na učinkovitost, kapacitet uklapanja i faktor skupljanja. Optimalni parametri su: udio alginata 1,5 %, udio proteina sirutke 1 % i liofilizacija kao način sušenja.

Ključne riječi: *inkapsulacija, elektrostatska ekstruzija, eterično ulje, sjemenke komorača, kapsule*

Rad sadrži: 49 stranica, 11 slika, 10 tablica, 48 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Maja Repajić

Pomoć pri izradi: Erika Dobrosravić, mag. nutr.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Maja Repajić (mentor)
3. doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 18. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

ENCAPSULATION OF FENNEL SEEDS ESSENTIAL OIL USING ELECTROSTATIC EXTRUSION METHOD

Katarina Robić, univ. bacc. nutr.
0058206702

Abstract: This study examined the effect of alginate content (1, 1.5 and 2%), whey protein content (0, 0.75 and 1.5%) and type of drying (air- and freeze-drying) on encapsulation of fennel seeds essential oil using electrostatic extrusion. Encapsulation yield, encapsulation efficiency, loading capacity, bead size and shape and beads swelling were determined. Yield ranged from 37.75 to 56.97%, efficiency from 6.16 to 51.95% and loading capacity from 37.88 to 82.60%. Average size of wet beads was 3.17 mm and of dry was 1.99 mm. Sphericity factor of wet beads ranged from 0.03 to 0.09 and shrinkage factor from 0.17 to 0.55. Rehydration caused swelling of the beads after 20 min. Alginate content showed significant effect on the yield, and all three varied parameters showed significant effect on the encapsulation efficiency, loading capacity and shrinkage factor. Optimal parameters were: content of alginate 1.5%, whey protein 1% and freeze-drying as a drying type.

Keywords: *encapsulation, electrostatic extrusion, essential oil, fennel seeds, beads*

Thesis contains: 49 pages, 11 figures, 10 tables, 48 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Maja Repajić, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Erika Dobrosravić, MSc

Reviewers:

1. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (president)
2. Maja Repajić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Ivona Elez Garofulić, PhD, Assistant professor (member)
4. Sandra Albino, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 18th, 2022

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KOMORAČ	2
2.1.1. Kemijski sastav sjemenki komorača	3
2.1.2. Eterično ulje sjemenki komorača	5
2.2. TEHNIKE INKAPSULACIJE.....	9
2.2.1. Elektrostatska ekstruzija.....	13
2.2.1.1. Inkapsulacija eteričnog ulja (elektrostatskom ekstruzijom)	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1 Eterično ulje sjemenki komorača	18
3.1.2. Kemikalije i standardi	18
3.1.3. Aparatura i pribor.....	19
3.2. METODE RADA.....	20
3.2.1. Priprema otopina alginata, proteina i emulzija	20
3.2.2. Elektrostatska ekstruzija.....	21
3.2.3. Sušenje na zraku i liofilizacija	22
3.2.4. Karakterizacija kapsula	23
3.2.4.1. Iskorištenje postupka inkapsulacije	23
3.2.4.2. Učinkovitost inkapsulacije i kapacitet uklapanja	24
3.2.4.3. Određivanje veličine i oblika kapsula.....	24
3.2.4.4. Određivanje faktora sferičnosti.....	25
3.2.4.5. Određivanje faktora skupljanja.....	26
3.2.4.6. Bubrenje kapsula.....	26
3.2.5. Obrada podataka.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. Iskorištenje postupka inkapsulacije.....	28
4.2. Učinkovitost inkapsulacije i kapacitet uklapanja	30
4.3. Veličina i oblik kapsula.....	34
4.4. Faktor sferičnosti i faktor skupljanja.....	37
4.5. Bubrenje kapsula.....	41
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je višegodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici štitarki (lat. *Apiaceae*). Jedna je od najstarijih ljekovitih i aromatičnih biljaka, koju su još kao lijek koristili Egipćani, Rimljani i Grci u Antičko doba. Komorač posjeduje antioksidativna, protuupalna, analgetska, hepatoprotektivna te mnoga druga poželjna svojstva. Također povoljno djeluje na rad gastrointestinalnog i dišnog sustava ljudi.

Najzastupljeniji kemijski spojevi, koji određuju aromatičan okus i ljekovita svojstva komorača su: *trans*-anetol, estragol i fenhon te je njihova koncentracija najviša u eteričnim uljima koja se dobivaju postupcima ekstrakcije i destilacije.

Eterična ulja sadrže razne kemijske spojeve, poput alkaloida, izoflavona, flavonoida, monoterpena, karotenoida, fenolnih kiselina, aldehida i dr., s biološkim svojstvima. Međutim, uslijed okolišnih uvjeta koncentracija i akumulacija ovih spojeva tijekom vegetacije može značajno varirati, dok su tijekom prerade u eterična ulja ili druge proizvode kemijski nestabilni te podložni degradaciji i oksidaciji. Inkapsulacija je tehnologija koja se koristi kako bi se očuvale bioaktivne molekule i sastavnice eteričnog ulja tijekom procesiranja i proizvodnje funkcionalnih proizvoda. Neke od najčešće korištenih metoda za inkapsulaciju biološki aktivnih spojeva su sušenje raspršivanjem, ionsko geliranje, ekstruzija, koacervacija, molekularna inkluzija i dr.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj udjela alginata i izolata proteina sirutke, kao i načina sušenja, na iskorištenje postupka inkapsulacije postupkom elektrostatske ekstruzije, učinkovitosti inkapsulacije i kapaciteta uklapanja. Također, proučavao se utjecaj navedenih parametara na faktor sferičnosti mokrih i suhih kapsula te na faktor skupljanja te je određivano bubrenje kapsula u vodenom mediju nakon sušenja na zraku i liofilizacijom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMORAČ

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je ljekovita i aromatična, višegodišnja zeljasta biljka koja pripada obitelji štitarki (lat. *Apiaceae*). Tvrda je nadzemna biljka, svijetlozelenih stabljika koje rastu iz razgranatog i vretenastog korijena. Biljka je uspravne i razgranate stabljike koja može narasti do 2 m visine. Listovi su višestruko razgranati, perastog oblika, nose sitne tanke listiće te mogu narasti do 40 cm (Javed i sur., 2019). Cvijet biljke je žute boje, sitan, a cvate u srpnju i kolovozu. Sjemenke komorača su lagano zakrivljene, eliptičnog oblika, zeleno žute boje, dok je plod suha sjemenka duljine 4-10 mm (Badgujar i sur., 2014) (slika 1).



Slika 1. Komorač (prema Douglas Schneider, 2014)

Komorač potječe s južnog Sredozemlja, međutim uslijed kultivacije se proširio po cijeloj Europi, sjevernoj Americi i posebice Aziji. Zbog svojih medicinskih i aromatičnih svojstava, biljka je bila dobro poznata i često upotrebljavana još od antičkih vremena (Badgujar i sur., 2014).

Raste u umjerenim klimama u rano proljeće i zimu, smatra se mediteranskom nadzemnom biljkom, i većinom raste na suhom, kamenom i vapnenastom tlu (Javed i sur., 2019).

Kao jedna od najstarijih začinskih biljaka, zbog svoje ekonomske važnosti kao i značajne upotrebe u farmaceutskoj industriji, smatra se jednom od najvažnijih medicinskih biljaka, a ima značajnu primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i medicinskoj industriji. Ima protuupalna, antispazmodička, antiseptička, karminativna, diuretička i analgetička svojstva te je učinkovita kod liječenja gastrointestinalnih poremećaja (Kooti i sur., 2015). Također pokazuje

antibakterijsku aktivnost, antifungalnu i antiviralnu aktivnost, kao i antioksidativno, antitumorno, kemoprotektivno, citoprotektivno, hepatoprotektivno, hipoglikemijsko, estrogeno djelovanje (Anka i sur., 2020).

Svi dijelovi biljke su jestivi i imaju razne primjene, uključujući korijen, stabljiku i sjemenke te postoji duga povijest korištenja u kulinarstvu i medicini. Zahvaljujući snažnom mirisu, komorač se koristi u aromama, lijekovima, kozmetici i prehrambenoj industriji.

Svježi korijen se dodaje salatama, osušene sjemenke potiču probavu masne hrane, ublažavaju bolove u trbuhu i djeluju antispazmički. Dok se čaj od listova koristi za ublažavanje kolika u novorođenčadi. Također se koristi kod prehlada i bronhijalnim problema (Javed i sur., 2019). Sjemenke komorača su aromom slične anisu i dodaju se u pekarske proizvode, mesna i riblja jela, sladoled, alkoholna pića i biljne napitke, dok su svi ostali dijelovi biljke korišteni u kulinarskim tradicijama diljem svijeta (Anka i sur., 2020).

Nedavno provedena istraživanja navode kako komorač i njegovo eterično ulje mogu imati ulogu u kontroliranju centralnog živčanog sustava i autonomnog živčanog sustava. Nadalje, komorač se svrstava i u medicinsku biljku s farmakološkim i fiziološkim aktivnostima, poput supresije unosa hrane, tjelesne mase, bijelog adipoznog tkiva, glukoze u krvi i kardiovaskularnih bolesti (Hong i sur., 2022).

2.1.1. Kemijski sastav sjemenki komorača

Anka i sur. (2020) navode kako sjemenke komorača sadrže 6,3 % vode, 9,5 % proteina, 10 % masti, 13,4 % minerala, 18,5 % vlakana i 42,3 % ugljikohidrata kao i prisustvo vitamina i minerala, kalcija, kalija, natrija, željeza, fosfora, tiamina, riboflavina, niacina i vitamina C. Saber i Eshra (2019) u svome istraživanju navode vrijednosti 8,4 % vode, 10,18 % proteina, 10,71 % masti, 18,01 % vlakana, te 40,19 % ugljikohidrata, što se slaže s vrijednostima koje navode Badgular i sur. (2014) te Bukhari i sur. (2014). Međutim, dobivene vrijednosti za vodu, proteine, masti i udio vlakana su niže od onih prikazanih u podacima o kemijskom sastavu hrane Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (eng. *The United States Department of Agriculture, USDA*) (2019).

USDA (2019) podaci o kemijskom sastavu hrane pokazuju kako 100 g sjemenki komorača sadrži 8,81 g vode, 15,8 g proteina, 14,9 g masti i 52,3 g ugljikohidrata. Od vitamina su najzastupljeniji vitamin C (21 mg/100 g), niacin (6,05 mg/100 g), vitamin B6 (0,47 mg/100 g) i riboflavin (0,353 mg/100 g). Od minerala sadrži: kalij (1690 mg/100 g), kalcij (1200 mg/100 g),

željezo (19 mg/100 g), fosfor (487 mg /100 g), magnezij (385 mg/100 g), natrij (88 mg/100 g), mangan (6,53 mg/100 g), cink (3,7 mg/100 g) i bakar (1,07 mg/100 g). Prema istraživanju Saber i Eshra (2019) mineralni sastav sjemenki komorača predstavlja: kalij 849,45 mg/100g, kalcij 583,6 mg/100 g, fosfor 470 mg/100 g, mangan 209,35 mg/100 g, magnezij 85,87 mg/100 g, natrij 15,91 mg/100 g i željezo 9,69 mg/100 g. Prema tome, sjemenke komorača se mogu smatrati dobrim biljnim izvorom kalija, kalcija i magnezija. Ti rezultati se većinom podudaraju s onima dobivenim u istraživanjima koja su proveli Badgubar i sur. (2014) te Bukhari i sur. (2014). Prema istraživanju u kojemu su Bukhari i sur. (2014) određivali kemijski sastav sjemenki komorača, sjemenke komorača sadrže $6,24 \pm 0,24$ % vode, $9,38 \pm 0,39$ % proteina, $9,76 \pm 0,34$ % masti, $18,21 \pm 0,73$ % vlakana, , što su niže vrijednosti od navedenih USDA bazi podataka, također su niže vrijednosti kalija, kalcija i natrija. Dobivene vrijednosti mineralnog sastava pokazale su visoki udio kalija ($852,45 \pm 33,25$ mg/100 g), zatim kalcija ($580,6 \pm 24,39$ mg/100 g), mangana ($211,35 \pm 7,40$ mg/100 g), natrija ($16,21 \pm 0,65$ mg/100 g) i željeza ($9,72 \pm 0,38$ mg/100 g), dok je cinka pronađeno u vrlo malim količinama. U istraživanju koje su proveli Saber i Eshra (2019), navodi se kako sjemenke komorača sadrže 64,37 mg/100 g ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline (GAE). Kooti i sur. (2015) navode kako plodovi komorača sadrže 10 do 12 % ulja koje je pohranjeno u kotiledonu sjemenki. Također, udio eteričnog ulja se kreće od 4 do 6 % i pod velikim utjecajem je lokacije rasta biljke. Sjemenke komorača sadrže 0,79 % eteričnog ulja i 5,82 % nehlapljivog ulja prema istraživanju El-Awadi i sur. (2010). Udio nehlapljivog ulja u sjemenkama komorača iznosi 7,89 % te sadrži $30,19 \pm 1,75$ % zasićenih i $69,81 \pm 1,75$ % nezasićenih masnih kiselina. Najznačajnije masne kiseline su petroselinska i oleinska kiselina, zatim laurinska kiselina te linolna masna kiselina, dok se u navedenom ulju nalazi prosječno $492,2 \pm 22,0$ mg/100 g sterola, gdje dominiraju stigmasterol i β -sitosterol (Balbino i sur., 2021).

F. vulgare sadrži fenolne spojeve koji se smatraju najvažnijim i najaktivnijim spojevima. U ekstraktu komorača se nalaze fenolni spojevi poput flavonoida, fenolnih kiselina, kumarina i tanina (Kooti i sur., 2015). Iako se sastav fenolnih spojeva značajno razlikuje među kultivarima, Kalleli i sur. (2019) su provedenim istraživanjem izolirali ukupno 33 fenolna spoja u svim kultivarima. Od tog broja prisutno je 12 fenolnih kiselina (kina, galna, protokatehinska, klorogenska, 4-*O*-kafeoilkina kiselina, kafeinska, siringinska, 1,3-di-*O*-kafeoilkina kiselina, 3,4-di-*O*-kafeoilkina kiselina, 4,5-di-*O*-kafeoilkina kiselina, *p*-kumarinska kiselina, *trans*-ferulinska kiselina, *o*-kumarinska kiselina i ružmarinska kiselina), 5 flavonola (katehin, rutin, kvercetrin,

kvercetin i kemferol) i 5 flavona (luteolin-7-*O*-glukozid, apegenin-7-*O*-glukozid, apigenin, cirsilinol i cirsilinol) te 2 flavanona (naringin i naringenin). Fenolne kiseline su predstavljale najveću skupinu fenola, i u ispitivanim uzorcima ekstrakata sjemenki komorača su se kretale u vrijednostima od 4,03 do 15,31 mg/g, dok su se flavonoidi nalazili u znatno manjim količinama (0,31-2,64 mg/g). Roby i sur. (2013) su svojim istraživanjem dokazali kako su u uzorcima sjemenki komorača glavni fenolni spojevi ružmarinska i klorogenska kiselina, dok se kvercetin i apigenin ističu kao glavni flavonoidi. Nadalje, sjemenke komorača sadrže i aktivne komponente vitamina E, odnosno njegove različite biološke oblike. Najzastupljeniji je γ -tokotrienol (18,2 mg/100 g), zatim α -tokotrienol (1,4 mg/100 g), te γ -tokoferol (0,5 mg/100 g) (Matthäus i Özcan, 2015).

2.1.2. Eterično ulje sjemenki komorača

Eterična ulja su sekundarni biljni metaboliti, smjese različitih hlapljivih spojeva karakterističnog mirisa i okusa (Kalodera i sur., 1998). Nastaju u preko 17 500 biljnih vrsta, i nalaze se u različitim biljnim organima, primjerice u: cvjetovima (*Citrus bergamia*, bergamot naranča), listovima (*Cymbopogon citratus*, limunska trava), stablu (*Santalum acuminatum*, sandalovina), rizomima (*Zingiber officinale*, đumbir), korijenu (*Chrysopogon zizanioides*, vetiver), plodovima (*Pimpinella anisum*, anis) i sjemenkama (*Myristica fragrans*, muškati oraščić) (Baptista-Silva i sur., 2020). Nemaju sve biljke sposobnost stvaranja eteričnog ulja te ta sposobnost pripada uglavnom sjemenjačama, a najvažnije biljne porodice koje proizvode eterično ulje se smatraju: *Pinaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae* i *Brassicaceae*. Eterična ulja se pohranjuju unutar biljke u posebnim stanicama (uljenicama), u intracelularnim prostorima ili kanalima, u spremnicima između kutikule i stanične membrane, odnosno u žlijezdama, žljezdanim dlakama i žljezdanim ljuskama (Kalodera i sur., 1998). Biološka uloga im je stvaranje mirisa koji privlače kukce radi oprašivanja, zaštita i odbijanje biljojeda (repelentnost), zaštita od fitopatogenih mikroorganizama i kukaca, te inhibicija rasta drugih biljaka, potencijalnih natjecatelja za isti prostor. Također, fiziološka uloga eteričnog ulja je djelovanje u smjeru smanjenja transpiracije, pošto većina biljaka koja ima mogućnost stvaranja eteričnog ulja raste u tropskim krajevima, Potpuno su hlapljiva, vrlo slabo topljiva u vodi, većina ih je na sobnoj temperaturi tekuća, dok neka mogu biti smolasta ili čak čvrsta. Svježe izolirana eterična ulja su bezbojne, blijedožućkaste ili smeđe boje. Sastav eteričnih ulja je vrlo različit, i ovisi o biljnom izvoru i metodi izolacije.

Najčešće metode izolacije su: hladno prešanje, ekstrakcija pomoću organskog otapala, destilacija vodenom parom, ugljičnim dioksidom, mikrovalovima, itd. (Vinceković i sur., 2020). Eterična ulja su smjese velikog broja različitih kemijskih spojeva, koji pripadaju različitim grupama organskih spojeva: ugljikovodicima, alkoholima, fenolima, aldehidima, ketonima, karboksilnim kiselinama, esterima, eterima, laktonima i dr. Prema ugljikovom skeletu i molekularnoj strukturi, sastojci eteričnih ulja se dijele u tri velike skupine: terpene, fenilpropanske derivate i ostale spojeve (Kalođera i sur., 1998):

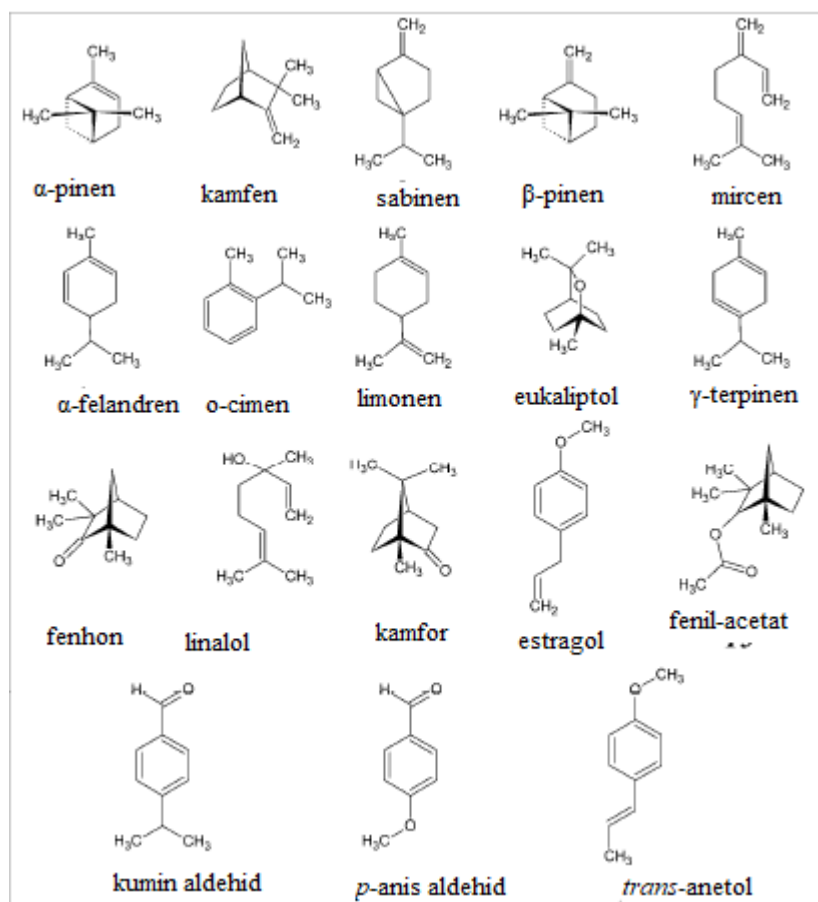
- a) Terpeni i terpenoidi su najzastupljenije sastavnice eteričnih ulja (90 %), i oni se definiraju kao ugljikovodici izgrađeni od izoprenskih jedinica (Vinceković i sur., 2020). Prema broju ugljikovih atoma terpeni se mogu svrstati u nekoliko velikih skupina, dok u sastav eteričnih ulja ulaze: monoterpeni (C_{10}), seskviterpeni (C_{15}), diterpeni (C_{20}) i triterpeni (C_{30}).
- b) Fenilpropanski derivati su prirodni spojevi C_6-C_3 strukture ugljikovodika. To uključuje aldehide, fenole i feniletere koji se odvođe od cimetine kiseline te kumarine. Posebnu grupu čine spojevi sa skraćenim ili eliminiranim pobočnim lancem, gdje ulaze fenilkarboksilne kiseline i jednostavni fenoli te lignin kao jedan od najznačajnijih fenilpropanskih derivata po količini, pošto je glavni sastojak drveta.
- c) Ostali spojevi uključuju lančaste ugljikovodike i njihove derivate s kisikom. U ovu skupinu pripadaju *n*-heptan kao najjednostavniji spoj ove vrste, zatim viši ugljikovodici s 15-30 C atoma, koji se nazivaju stearopteni. Također, u ovu skupinu se ubrajaju i spojevi s dušikom i sumporom koji su prisutni u malom broju eteričnih ulja.

Zbog velikog broja različitih kemijskih spojeva postoji široki spektar njihovog djelovanja. Zbog svojih poželjnih karakteristika kao što su ekološka prihvatljivost, ekonomičnost, biorazgradivost i mogućnost specifičnog ciljnog djelovanja vrlo su cijenjeni biljni pripravci. Primjenjuju se u medicini, kozmetičkoj, prehrambenoj industriji, poljoprivredi i dr. Neka od najčešće spominjanih svojstava su antimikrobna, antikancerogena, analgetička, antioksidativna, protuupalna, druga imunomodulatorna, antiagregacijska i antitrombotička svojstva (Vinceković i sur., 2020).

Analizom plinskom kromatografijom uz masenu spektrometriju (eng. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) eteričnog ulja sjemenki komorača Saber i Eshra (2019) utvrdili su kemijski sastav, koji čini u najvećoj količini *trans*-anetol (77,91 %), zatim estragol (5,65 %), anisaldehyd (4,54 %), D-limonen (4,44 %) i anisol (3,59 %).

Hong i sur. (2022) su GC-MS analizom eteričnog ulja sjemenki komorača odredili 1 aldehid: *p*-anisaldehid ($1,18 \pm 0,15$ %), zatim spojeve: α -pinen ($6,33 \pm 0,54$ %), limonen ($2,84 \pm 0,07$ %), estragol ($6,02 \pm 0,15$ %), *cis*-anetol ($1,48 \pm 0,16$ %), *trans*-anetol ($50,69 \pm 15,37$ %) i 1 keton: fenhon ($19,18 \pm 4,32$ %). Upravo *trans*-anetolu, *cis*-anetolu i estragolu se pripisuje anti-kolesterol, anti-pretilost, anti-upalni i protustresni učinak. Određeni kemijski spojevi imaju karakteristično djelovanje. Dok fenhon ima antifungalni i antidepresivni učinak, kao i djelovanje lokalnog anestetika i učinak zacjeljivanja rana. Spoj α -pinen, monoterpenska komponenta, pokazuje pozitivne učinke kod supresije tumora, oksidacije, antibakterijske aktivnosti, upalnih procesa, stresa, konvulzija i akutne boli, dok limonen, kao druga bitna monoterpenska komponenta, iskazuje antitumorni i protuupalni učinak te pokazuje pozitivne učinke kod smanjivanja hepatotoksičnosti.

Shahat i sur. (2011) su izolirali eterično ulje sjemenki komorača iz slatkog, gorkog i firentinskog komorača te prema njima postoji 18 glavnih spojeva, a slika 2 prikazuje njihova imena i kemijske strukture.



Slika 2. Kemijska struktura hlapljivih spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača (prema Shahat i sur., 2011)

Belabdelli i sur. (2020) su u svome istraživanju dobili prinos ulja od 1,42 % te su izolirali 10 spojeva. U najvišim količinama prisutni su estragol (84,8 %), zatim limonen (7,8 %) i fenhon (3,1 %), zatim α -pinen (1,3 %), 1,8-cineol (0,7 %), (*Z*)- β -*O*-cimen (0,7 %), (*E*)-anetol (0,6 %), sabinen (0,3 %) i mircen (0,3 %).

Također, Shahat i sur. (2011) navode kako u istraživanjima provedenom na eteričnom ulju sjemenki komorača iz Egipta glavne sastavnice ulja su estragol (51,04 %), limonen (11,45 %), L-fenhon (7,36 %) i *trans*-anetol (3,62 %). Međutim, kod eteričnog ulja sjemenki komorača iz Kine spojevi s najvišim udjelima su *trans*-anetol (54,26 %), estragol (20,25 %), L-fenhon (7,36 %) i limonen (2,41 %). Kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača može varirati te je znatno ovisan o metodi izolacije eteričnog ulja, okolišnim uvjetima uzgoja komorača, kao i njegovoj genetičkoj pozadini i podrijetlu.

Belabdelli i sur. (2020) su u svome istraživanju postupkom vodene destilacije izolirali 1,42 % eteričnog ulja iz samljevenih sjemenki, dok su Napoli i sur. (2010) u svome istraživanju iz sjemenki izolirali 0,4 do 7,5 % eteričnog ulja. Vidljivo je kako udjeli eteričnog ulja znatno variraju unutar različitih istraživanja, što se može pripisati različitim metodama i vremenu izolacije, različitim veličinama čestica sjemenki kao i porijeklu sjemenki.

Saber i Eshra (2019) su dokazali antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja sjemenki komorača prema Gram negativnim i Gram pozitivnim bakterijama te je učinak bio jači kod Gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, nego kod Gram negativne bakterije *Escherichia coli*, čime se pokazuje kako komorač može biti dobar prirodni prehrambeni konzervans. Također eterično ulje komorača ne utječe niti na promjenu boje i teksture prehrambenih proizvoda te dodavanjem eteričnog ulja komorača se može utjecati na brzinu oksidacije. Za aromatičan okus prehrambenih proizvoda zaduženi su anetol, estragol i limonen, dok *trans*-anetol ima snažna antimikrobna svojstva protiv bakterija, kvasaca i parazita. Također, Badgular i sur. (2014) navode antioksidativno, antibakterijsko, citotoksično, antikancerogeno, antifungalno, antivirusno i antialergijsko djelovanje eteričnog ulja sjemenki komorača, uz antitromboidno i antikancerogeno djelovanje *trans*-anetola.

2.2. TEHNIKE INKAPSULACIJE

U posljednjih nekoliko godina uloga hrane nije samo u osiguravanju osnovnih hranjivih tvari i zadovoljavanja ljudske potrebe za hranom, već se prehrana i izbor namirnica vrši s ciljem potencijalnog pozitivnog djelovanja na zdravlje ljudi, prevencije i ublažavanja simptoma različitih oboljenja. Takva očekivanja dovode do širenja istraživanja u području funkcionalnih prehrambenih proizvoda s poboljšanom hranjivom vrijednošću i biološkom aktivnošću te je u posljednje vrijeme fokus znanstvenika i prehrambene industrije na biološki aktivnim spojevima koji se mogu koristiti kao lijekovi, sastojci funkcionalne hrane ili nutraceutici.

Dulje vrijeme se koristi dodavanje funkcionalnih sastojaka hrani kako bi se poboljšao okus, boja, tekstura ili produljila trajnost proizvoda, međutim, industrija se sve više fokusira k uključivanju biološki aktivnih spojeva s povoljnim učinkom na zdravlje. To uključuje vitamine, probiotike, mineralne tvari, polifenole, omega-3-masne kiseline i fitosterole (Đorđević i sur., 2014). Međutim stabilnost takvih biološki aktivnih spojeva, koji se većinom izoliraju iz prirodnog materijala, je ključan kriterij kod dodavanja u prehrambene proizvode te predstavlja problem pošto su navedeni spojevi osjetljivi na kisik, svjetlost, toplinu i vodu (Champagne i Fustier, 2007). Kako je većina navedenih komponenti nestabilna pri normalnim uvjetima ili ostavlja nepoželjan okus, njihova upotreba je ograničena. Upravo zbog toga postoji potreba za upotrebom tehnika koje će osigurati stabilnost funkcionalnih komponenti u funkcionalnim proizvodima tijekom njihove proizvodnje i skladištenja (Dias i sur., 2017).

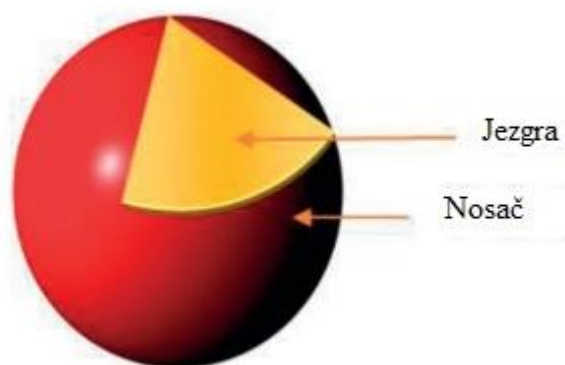
Inkapsulacija aktivnih komponenti, uključujući eterična ulja, ima 2 funkcije: (1) povećati oksidativnu stabilnost, termostabilnost, fotostabilnost, rok trajanja i biološku aktivnost, (2) osigurati njihovo ciljano i kontrolirano otpuštanje.

Inkapsulacija je izrazito važna kod upotrebe eteričnih ulja zbog nekih njihovih karakteristika, poput hlapljivosti, intenzivnog mirisa i okusa, toksičnosti ovisno o dozi i vrlo visoka biološka aktivnost. Inkapsulacija također štiti eterična ulja od degradacije i transformacija uslijed probave te štiti organizam od neželjenih učinaka eteričnih ulja. Također, inkapsulacija eteričnih ulja povećava njihovu biodostupnost. Razvoj različitih tehnika inkapsulacije omogućava široko korištenje eteričnih ulja u farmaceutskoj industriji i kozmetičkoj industriji, kao i prehrambenoj (Dajic Stevanovic i sur., 2020).

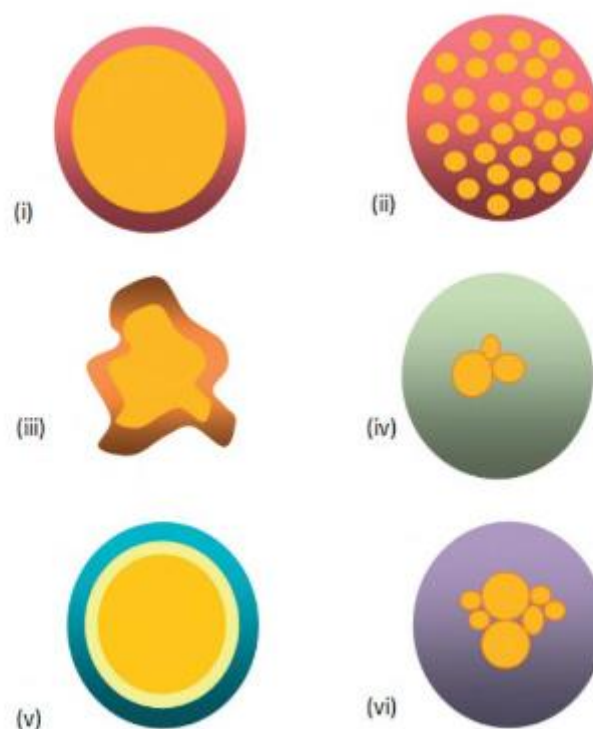
Onsaard i Onsaard (2019) definiraju inkapsulaciju kao proces u kojemu se čvrsta, tekuća ili plinovita aktivna tvar oblaže s jednim ili kombinacijom više materijala. Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, aktivni agens, unutarnja faza ili punjenje, dok se tvar kojom se oblaže naziva

membrana, ljuska, vanjska faza, nosač odnosno matriks. Vanjska faza služi kako bi zaštitila unutarnju fazu od vanjskih čimbenika kao što su svjetlost, kisik, vlaga i dr. Prema tome, svrha inkapsulacijskih tehnika je: (1) zaštita unutarnje faze (jezgre) od vanjskih čimbenika poput kisika, temperature, vlage i svjetlosti; (2) maskiranje mirisa, okusa i aktivnosti inkapsuliranih tvari; (3) kontrolirano otpuštanje aktivnih komponenti (kontrolirano ili odgođeno otpuštanje); (4) razdvajanje inkompatibilnih komponenti; (5) pretvorba tekućina u slobodno kretajuće krutine; (6) povećanje oksidativne stabilnosti i ciljano otpuštanje inkapsuliranog materijala (Onsaard i Onsaard, 2019).

Razlikuje se pet vrsta kapsula, jednojezgrene, višejezgrene, višeslojne, nepravilne i tip matriks. Slika 3 prikazuje jednojezgreni, najjednostavniji oblik kapsule. Veličina i oblik kapsula značajno ovise o vrsti korištene vanjske faze (nosača) i tehnika inkapsulacije te razlikujemo mikrokapsule, mikrokuglice, višejezgrene, jednojezgrene i mnoge druge (slika 4).



Slika 3. Shematski prikaz strukture jednojezgrene kapsule (prema Onsaard i Onsaard, 2019)



Slika 4. Različite vrste kapsula: (i)- jednojezrena kapsula, (ii)- matriks, (iii)- nepravilna kapsula, (iv)- višejezrena kapsula, (v)- kapsula s višeslojnim nosačem i (vi)- složena kapsula (prema Onsaard i Onsaard, 2019).

Metode inkapsulacija su mnogobrojne i uključuju: primjenu superkritičnih fluida, sušenje raspršivanjem, ekstruziju, kokristalizaciju, molekularnu inkluziju, emulzifikaciju, liposome koacervaciju, ionsko geliranje, sušenje hlađenjem i zamrzavanjem (Shishir i sur., 2018; Đorđević i sur., 2016). Tablica 1 prikazuje pregled nekih od najčešće korištenih metoda inkapsulacije, njihove prednosti i nedostatke, kao i konačan produkt.

Tablica 1. Pregled inkapsulacijskih tehnika (prema Đorđević i sur., 2016)

Tehnika inkapsulacije	Princip	Prednosti	Nedostaci	Proizvod
Sušenje raspršivanjem	Atomizacija jezgre i nosača u vrućoj komori gdje dolazi do isparavanja vode.	Kao jezgra se mogu koristiti hidrofilni i hidrofobni materijali. Metoda je brza, ponovljiva i jeftina. Mogućnost velike proizvodnje u kontinuiranom načinu.	Visoka temperatura rada. Teško kontroliranje veličine čestica. Prinosi kod malih serija su umjereni.	Prah sferičnihi čestica promjera 10-100 μm
Ekstruzija	Potiskivanje otopine polimera kroz špricu i nastanak kapljica koje se stvrđnu u gel mikrosfere.	Aktivna tvar je u potpunosti okružena s nosačem. Relativno niske temperature operacija.	Ograničenje na korištenje otopina nosača niske viskoznosti. Nizak kapacitet proizvodnje. Kapsule gela se moraju odvojiti od tekućeg medija u koji se sakupljaju.	Kapsule gela (tip matriks) promjera 0,2-2000 μm
Emulzifikacija	Sredstvo za geliranje se dodaje u emulziju polimera s vodom u ulju.	Spoj je potpuno okružen nosačem. Lakši prelazak na industrijsku proizvodnju od ekstruzije.	Kapsule se moraju odvojiti od medija u koji se skupljaju. Skuplje od ekstruzije i teže kontroliranje procesa	Kapsule gela (tip matriks) promjera 20-1000 μm
Sušenje hlađenjem/zamrzavanjem	Otopljeni spoj jezgre i nosača je raspršuje u hladnu komoru gdje dolazi do očvršćivanja čestica.	Postupak je pogodan za spojeve osjetljive na toplinu	Niska učinkovitost inkapsulacije. Teško kontroliranje veličine čestica. Hidrofobni karakter čestice. Brzo oslobađanje aktivne komponente	Čestice tipa matriks promjera 20-200 μm
Molekularna inkluzija	Izdvajanje nastaje nakon dodatka nosača ciklodekstrina u vodenu otopinu jezgre, nakon čega slijedi miješanje ili grijanje.	Visoka temperaturna stabilnost kapsula, povećana topljivost aktivnog spoja i kontrolirano otpuštanje aktivnog spoja. Učinkovita zaštita.	Ograničena upotreba na nepolarne spojeve sa odgovarajućim dimenzijama molekule. Skupi korišteni spojevi.	Čestice promjera 0,001-001 μm

Uz odabir odgovarajuće metode inkapsulacije, jedan od najvažnijih faktora za uspješnu inkapsulaciju je također i odabir odgovarajuće vanjske faze ili nosača.

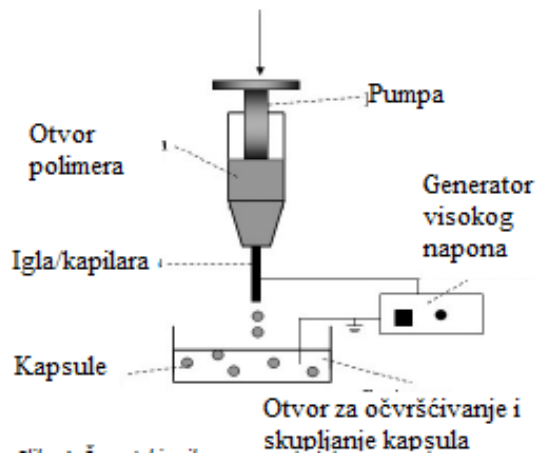
Primjeri najčešće korištenih nosača za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji dani su u tablici 2 (Timilsena i sur., 2020).

Tablica 2. Primjeri najčešće korištenih nosača za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji
(prema Timilsena i sur., 2020)

Podrijetlo	Ugljikohidratni polimeri	Proteini	Lipidi
Biljno	Škrob i njegovi derivati Celuloza i njezini derivati Polisaharidi Biljni eksudati (arapska guma, Karaya guma)	Gluten (kukuruz) Izolati (grašak, soja, pšenica, chia sjemenke)	Masne kiseline/alkoholi Gliceridi Voskovi Fosfolipidi
Morsko	Karagenan Alginat		
Mikrobno/životinjsko	Ksantan Gelan guma Dekstran Kitozan	Kazeini Proteini sirutke Želatina	Masne kiseline/alkoholi Gliceridi Voskovi Fosfolipidi (šelak)

2.2.1. Elektrostatska ekstruzija

Elektrostatska ekstruzija je disperzijska metoda koja se zasniva na primjeni elektrostatske sile koja djeluje na površinu polimera na vrhu igle/kapilare pri čemu dolazi do stvaranja kapljica koje zatim formiraju kapsule u posudi za učvršćivanje/skupljanje kapsula (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz osnovnih dijelova aparature za izvođenje elektrostatske ekstruzije
(prema Kostić i sur., 2012)

Kapljice se formiraju kada električna sila djeluje na površinu tekućine, uzrokujući nastanak kapljica. Konačan promjer kapljica ovisi o promjeru korištene igle, protoku polimera i električnom polju (Prüsse i sur., 2008).

Bamidele i Emmambux (2021) naglašavaju kako jedan od nedostataka elektrostatske ekstruzije je taj što inkapsulacija biološki aktivnih tvari ne može biti ostvarena u većem opsegu. Također, izbor nosača koji mogu biti korišteni je vrlo ograničavajući, a svodi se na alginat i gume. Kostić i sur. (2012) navode kako je najviše znanja i iskustva o utjecaju parametara postupka i primjenom elektrostatske ekstruzije dobiveno primjenom alginata kao nosača za inkapsulaciju. Prednosti elektrostatske ekstruzije (u odnosu na ostale metode ekstruzije) je ta što ne zahtijeva korištenje visoke temperature i nije obavezno provođenje sušenja dobivenih kapsula. Također, metoda zahtijeva malo energije te posljedično nije skupa i može provesti inkapsulaciju biološki aktivnih spojeva s jedinstvenim karakteristikama.

Timilsena i sur. (2020) navode kako je dobivanje većih kapsula, promjera 0,1-5,00 mm zapravo prednost ove tehnike u odnosu na druge metode inkapsulacije. Također navode kako korištenje izolata proteina sirutke je izvrstan odabir pri inkapsulaciji višestruko nezasićenim masnim kiselinama (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) bogatih ulja i hlapljivih spojeva te da taj protein pruža učinkovitost inkapsulacije do 89,6 %, u odnosu na proteine soje koji iskazuju učinkovitost do 75,9 %.

Jedan od najčešće korištenih prirodnih polimera je alginat, polisaharid ekstrahiran iz smeđih

algi. Natrijev alginat, kao najčešće korišteni, u svojoj strukturi sadrži dvije karboksilirane monosaharidne jedinice: α -L-guluronsku kiselinu i β -D-manuronsku kiselinu, koje su povezane α -1,4-glikozidnom vezom (Ramdhan i sur., 2020). Zbog prisutnosti karboksilnih skupina natrijev alginat je negativno nabijen te u prisustvu dvovalentnih kationa kao što je kalcij, formira gel. Vanjski sloj kapsule nastaje zbog interakcija guluronske kiseline s kalcijevim kationima (Jurić, 2020). Iako ima dobre karakteristike za inkapsulaciju, koje se povezuju sa sposobnošću stvaranja gela, postoji nekoliko nedostataka. Alginatni matriks gela je porozan, vrlo propusan i razgradiv pa je teško kontrolirati otpuštanje spojeva koje inkapsulira. Kombinacija s ostalim polimerima kao što su hidrokoloidi, proteini i škrob se predlaže kao rješenje (Ramdhan i sur., 2020).

2.2.1.1. Inkapsulacija eteričnog ulja (elektrostatskom ekstruzijom)

Eterična ulja su kompleksne smjese hlapljivih i prirodnih spojeva koje karakterizira snažan miris te su sekundarni metaboliti aromatskog bilja. Njihova poznata široka upotreba je u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te kod funkcionalne hrane. Međutim, vanjski čimbenici poput temperature, kisika i svjetlosti imaju negativan učinak na biološku aktivnost eteričnih ulja. Inkapsulacijom eteričnih ulja se nastoji optimirati njihovo otpuštanje, zaustaviti termooksidacija, povećati njihovu biološku stabilnost, zaštititi od oksidativnih reakcija s okolišem, smanjiti hlapljivost, povećati bioaktivnost, smanjiti toksičnost te poboljšati i olakšati primjenu kod ljudi (Rodríguez i sur., 2016). S tim načinom primjena inkapsuliranog eteričnog ulja može biti proširena na veterinu, agrikulturu, biomedicinu, industrijske kemikalije, osobnu njegu, senzorska svojstva industrije. Tablica 3 prikazuje primjere eteričnih ulja, metode inkapsulacije, korištene nosače, učinkovitost provedene inkapsulacije i veličinu dobivenih kapsula.

Tablica 3. Primjeri inkapsulacije eteričnih ulja (prema Reis i sur., 2022 i Rodriguez i sur., 2016)

Vrsta eteričnog ulja	Metoda inkapsulacije	Nosač	Učinkovitost inkapsulacije (EE%)	Veličina kapsula
<i>Lippia sidoides</i> eterično ulje	Sušenje raspršivanjem	Alginat	21-48 %	223-399 nm
Eterično ulje jasmína	Kompleksna koacervacija	Želatína/guma	-	50-112 nm
Eterično ulje origána	Emulzifikacija i ionsko geliranje	Kitozan	21-47 %	40-80 nm
Eterično ulje ružmarína	Emulzifikacija/sušenje zaleđivanjem Sušenje raspršivanjem	Proteini sirutke i maltodekstrin		
Eterično ulje hibiskusa	Emulzifikacija (ekstruzija i liofilizacija)	Natrijev alginat i pektin	77 %	450-575 μ m
Eterično ulje đumbíra	Emulzifikacija i sušenje raspršivanjem	Arapska guma, maltodekstrin i inulin	93 %	2-18,8 μ m
Eterično ulje klinčića	Emulzifikacija	Natrijev kazeinat i pektin	88 %	0,17-0,41 μ m

Razne metode inkapsulacija su se predlagale za inkapsulaciju tekućih aroma poput limonena, među njima sušenje raspršivanjem je najpopularnija i najšire korištena metoda. Međutim, teško je ukloniti vodu isparavanjem i pri tome zadržati aromatične hlapljive spojeve koji su puno hlapljiviji od vode. U takvim slučajevima tehnike ekstruzije su bolji izbor, u kojima biopolimerni gel oblaže kapljicu ulja. Također, ekstruzijske tehnike mogu biti prednost kada postoji potreba za većim kapsulama, u odnosu na one dobivene sušenjem raspršivanjem (100-1000 μ m u odnosu na 10-150 μ m za one dobivene sušenjem raspršivanjem), što može biti poželjno kod željene vidljive strukture ili teksturalnog učinka (primjerice kod hrskave hrane) (Lević i sur., 2015). Elektrostatska ekstruzija je primjerena tehnika za procesiranje polimernih otopina različitih viskoziteta i proizvodnju poželjnih kapsula jednoličnog oblika. Temelji se na korištenju elektrostatskih sila na vrhu igle kako bi se stvorio nabijeni mlaz sitnih kapljica (Lević i sur., 2015).

Alginat, anionski polimer izoliran iz smeđih algi je izabran kao najpoželjniji polimer kod ionskog geliranja. Biokompatibilan je, jeftin i netoksičan polimer. Ima sposobnost tvorbe ionskih veza za polivalentnim kationima poput kalcija, stvarajući poprečno povezane strukture između α -L-guluronskih kiselina, iz različitih alginatnih lanaca te tako stvarajući polimerni film. Kvaliteta procesa inkapsulacije ovisi o kapacitetu uklapanja, učinkovitosti inkapsulacije i iskorištenju procesa (Benavides i sur., 2016).

Međutim, zbog lošeg kapaciteta emulzifikacije alginata, koriste se različite kombinacije s ostalim biopolimerima kako bi se optimiralo otpuštanje spojeva i poboljšale funkcije alginatnih kapsula. Volić i sur. (2018) su u svome istraživanju uz alginat kao nosač koristili i proteine soje, koji su lako dostupni, biorazgradivi, netoksični i termostabilni, međutim zbog ograničene topljivosti u vodi i velike viskoznosti kod viših koncentracija, izazovno je odrediti optimalan omjer alginata i proteina kako bi se dobile jednolične i sferične kapsule. Prilikom inkapsulacije eteričnog ulja timijana postupkom elektrostatske ekstruzije, Volić i sur. (2018) su promatrali utjecaj različitih udjela alginata (1-2,5 %) i proteina soje (0-1,5 %) na veličinu kapsula, oblik, morfološke karakteristike kao i učinkovitost inkapsulacije. Pri tome su zaključili kako niže koncentracije alginata doprinose sferičnom obliku kapsula, dok pri višim koncentracijama alginata dolazi do odgođenog otpuštanja eteričnog ulja. Nije uočena ovisnost učinkovitosti inkapsulacije o različitim udjelima alginata i proteina soje. Također, uočili su kako dodatak proteina soje (do 1 %) povećava sposobnost bubrenja i odgađa otpuštanje eteričnog ulja. Nakon sušenja kapsula, uočili su naboranu površinu kapsula koje uz alginat u sastavu imaju i proteine soje te narušen oblik kapsula pri udjelima alginata većim od 1,5 %. Ustanovili su i kako dodatak proteina soje utječe na smanjenje veličine kapsula.

Kokina i sur. (2019) su korištenjem elektrostatske ekstruzije kao metode inkapsulacije eteričnih ulja proučavali utjecaj inkapsuliranog eteričnog ulja na sposobnost neutralizacije slobodnih radikala tijekom vremena. Inkapsulacijom elektrostatskom ekstruzijom eteričnih ulja lavande, čajevca, bergamota i peperminta, uz udio od 4 % eteričnog ulja i 2 % alginata te liofilizacijom, uočeno je zadržavanje antioksidativnog potencijala nakon 12 mjeseci kod svih uzoraka eteričnih ulja. Time zaključuju kako je inkapsulirano eterično ulje pogodnije i otpornije na procesiranje od slobodnog eteričnog ulja. Također, nisu uočili značajne razlike u morfološkim karakteristikama dobivenih kapsula prilikom korištenja različitih eteričnih ulja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1 Eterično ulje sjemenki komorača

Za provođenje eksperimentalnog dijela rada korišteno je komercijalno dostupno eterično ulje sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) tvrtke IREKS AROMA d.o.o., Jastrebarsko, koje je bilo čuvano pri +4 °C do korištenja.

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Destilirana voda
- Natrijeva sol alginske kiseline niske viskoznosti (NaAlg) (Alfa Aesar, Kandel, Njemačka)
- Izolat proteina sirutke, Volactive UltraWhey 90 instant (Volac, Hertfordshire, Velika Britanija)
- Emulgator Tween ©20 za molekularnu biologiju (AppliChem GmbH, Darmstadt, Njemačka)
- Bezvodni kalcijev klorid (CaCl_2) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Priprema 5%-tni kalcijev klorid: odvaži se 50 g kalcijevog klorida i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1000 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3) (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska)
Priprema 1 M natrijev hidrogenkarbonat: odvaži se 8,401 g natrijeva hidrogenkarbonata i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Bezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4) (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska)
- 96%-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

3.1.3. Aparatura i pribor

- Staklene čaše, volumena: 10, 50, 100, 150, 250, 500 i 1000 mL
- Stakleni lijevak
- Staklena menzura volumena 100 i 500 mL
- Metalna žličica
- Metalna špatula
- Tikvica s okruglim dnom volumena 250 mL
- Stakleni čep za tikvicu s okruglim dnom
- Odmjerna tikvica volumena 100 mL
- Odmjerna tikvica volumena 1000 mL
- Aparatura za izolaciju eteričnog ulja po Clevengeru (Europska Farmakopeja, 2008)
- Viale, volumena 1,5 mL (navoj N9, ravno dno, 11,6 x 32 mm grad.)
- Plastični čep sa septom za vialu
- Plastične lađice za vaganje
- Plastične posude
- Plastične posudice (urinarke)
- Plastične Falcon epruvete volumena 15 mL
- Plastični čepovi za Falcon epruvete
- Plastični pladanj
- Magneti
- Filter papir
- Staničevina
- Univerzalni lakmus papir
- Mikropipete Eppendorf, volumena 10, 100 i 1000 μ L
- Analitička vaga (OHAUS, Parsippany, SAD)
- Digitalni homogenizator ULTRA-TURRAX T25 (IKA, Staufen, Njemačka)
- BÜCHI inkapsulator B-390 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)
- Magnetska miješalica RT 5 power (IKA, Staufen, Njemačka)
- BÜCHI vodena kupelj Heating Bath B-490 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)

- Mikrometar s digitalnim zaslonom DIGI-MET (Helios-Preisser, Gammertingen, Njemačka)
- Liofilizator Alpha 1-4 LSCPlus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Vodena kupelj s tresilicom (MEMMERT, Schwabach, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema otopina alginata, proteina i emulzija

Priprema otopina alginata

U staklene čaše s 500 mL destilirane vode, na površinu se posipa redom 5; 7,5 i 10 g natrijeve soli alginske kiseline, kako bi se dobile otopine alginata odgovarajućeg udjela, (1, 1,5 i 2 %, *m/V*). Pripremljene otopine se odlože u hladnjak da odstoje 72 h. Prije korištenja, otopine se promiješaju na Ultra-Turrax homogenizatoru.

Priprema otopine proteina

Izvaže se 0,375 i 0,75 g izolata proteina sirutke te prenese u staklenu čašu s 50 mL destilirane vode i lagano promiješa kako bi se dobile otopine odgovarajućeg udjela proteina (0,75 i 1,5 %, *m/V*). Dodavanjem 0,750 mL 1 M natrijevog hidrogenkarbonata podese se pH otopine na 8 te se otopina proteina sirutke zagrijava u vodenoj kupelji 40 min pri temperaturi 80 °C.

Priprema emulzija

Emulzije se pripreme prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 4, pri čemu se u staklenu čašu doda 50 mL alginata, zatim 50 mL destilirane vode ili otopine proteina, ovisno o kojem uzorku se radi. Zatim se u sve uzorke doda eterično ulja sjemenki komorača (5 %, *m/V*) te emulgator (0,5 %, *m/V*). Sve zajedno se stavi na homogenizaciju 3 min.

Tablica 4. Plan eksperimenta

UZORAK	SUŠENJE	UDIO ALGINATA (%)	UDIO PROTEINA (%)
1	zrak	1	0
2			0,75
3			1,5
4		1,5	0
5			0,75
6			1,5
7		2	0
8			0,75
9			1,5
10	liofilizacija	1	0
11			0,75
12			1,5
13		1,5	0
14			0,75
15			1,5
16		2	0
17			0,75
18			1,5

3.2.2. Elektrostatska ekstruzija

Dobivena emulzija se prebaci u staklenu bocu te se inkapsulacija provodi na uređaju Büchi Encapsulator B-390, prema parametrima prikazanim u tablici 5.

Tablica 5. Parametri elektrostatske ekstruzije

Frekvencija (Hz)	60
Elektroda (V)	500
Amplituda	6
Tlak (mbar)	Tlak se regulira ovisno o viskoznosti uzorka do max. 1000 mbar

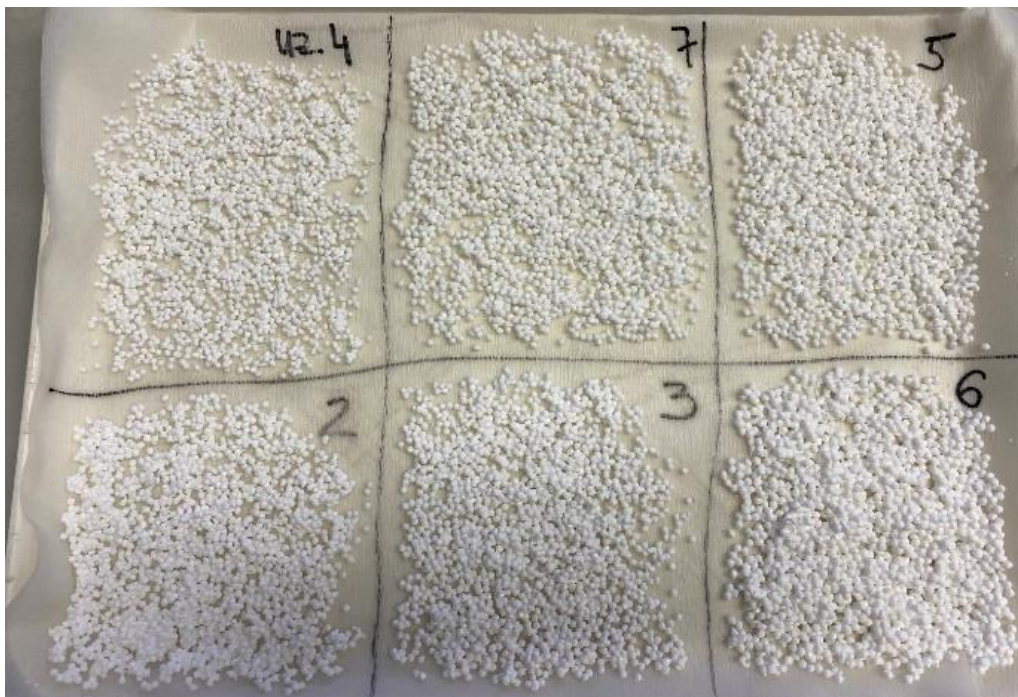
U plastičnu posudu se ulije 5 %-tni kalcijev klorid, stave 2 magneta te se ona postavi na magnetsku miješalicu ispod otvora igle inkapsulatora.

Alginat iz emulzije, prilikom kontakta s dvovalentnim kalcijevim ionima stvara mrežu gela pri čemu dolazi do nastanka kapsula omotanih kalcijevim alginatom.

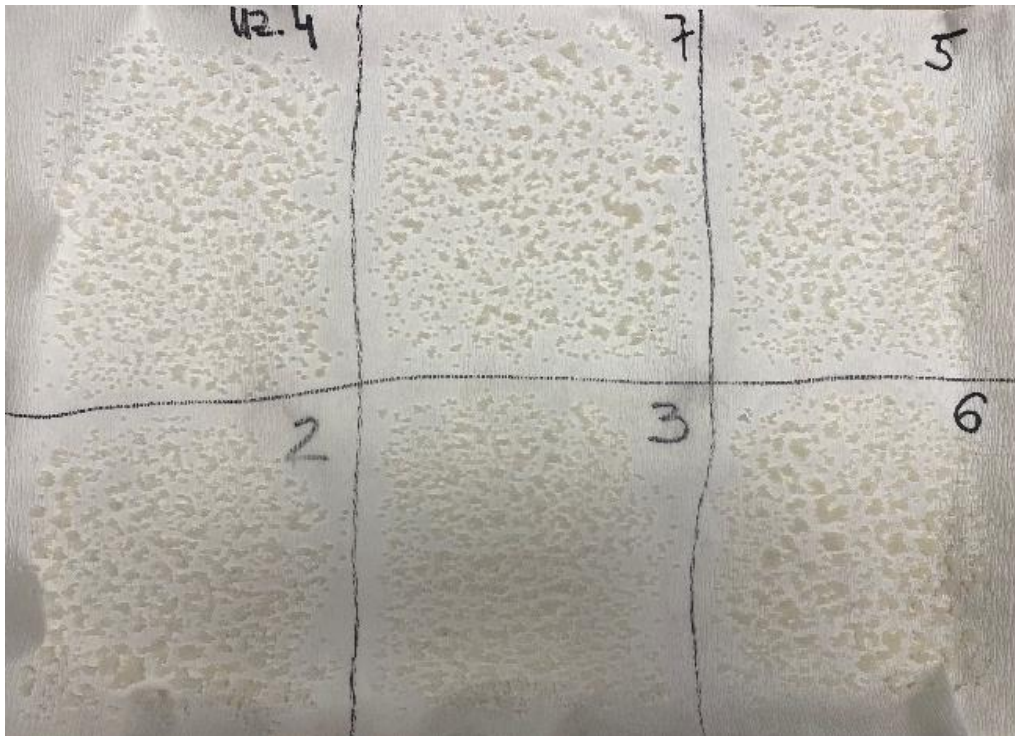
Dobivene kapsule se zatim ostave na miješanju na magnetskoj miješalici, u otopini 5 % kalcijeva klorida oko 15 min. Nakon miješanja, kapsule se profiltriraju kroz filter papir i stakleni lijevak te isperu destiliranom vodom.

3.2.3. Sušenje na zraku i liofilizacija

Nakon filtracije, kapsule (uzorci 1-9) se postave na filter papir u tankom sloju (slika 6) i ostave 72 h da se suše na zraku (slika 7). Uzorci 10-18 se suše postupkom liofilizacije. Prije postupka liofilizacije uzorci se zamrznu pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a liofilizacija se provede pri $-55\text{ }^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$.



Slika 6. Mokre kapsule prije sušenja na zraku (vlastita fotografija)



Slika 7. Suhe kapsule nakon sušenja na zraku (vlastita fotografija)

3.2.4. Karakterizacija kapsula

3.2.4.1. Iskorištenje postupka inkapsulacije

Iskorištenje (eng. *microencapsulation process yield*, Y) je odnos između mase dobivenih kapsula i mase korištene emulzije.

Iskorištenje postupka inkapsulacije računa se prema jednadžbi [1] (Benavides i sur., 2016):

$$Y(\%) = \frac{m_{mc}}{m_{em}} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_{mc} = masa dobivenih kapsula (g)

m_{em} = masa korištene emulzije (g)

3.2.4.2. Učinkovitost inkapsulacije i kapacitet uklapanja

Učinkovitost inkapsulacije (eng. *encapsulation efficiency*, EE) i kapacitet uklapanja (eng. *loading capacity*, LC) računaju se prema jednadžbama [2-3] (Benavides i sur., 2016):

$$EE (\%) = \frac{m_{eo}}{m_0} \cdot 100 \quad [2]$$

$$LC (\%) = \frac{m_{eo}}{(m_{eo} + m_{al})} \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je:

m_0 = početna masa eteričnog ulja (g)

m_{eo} = masa inkapsuliranog eteričnog ulja (g)

m_{al} = masa polimera (alginata) (g)

Princip metode

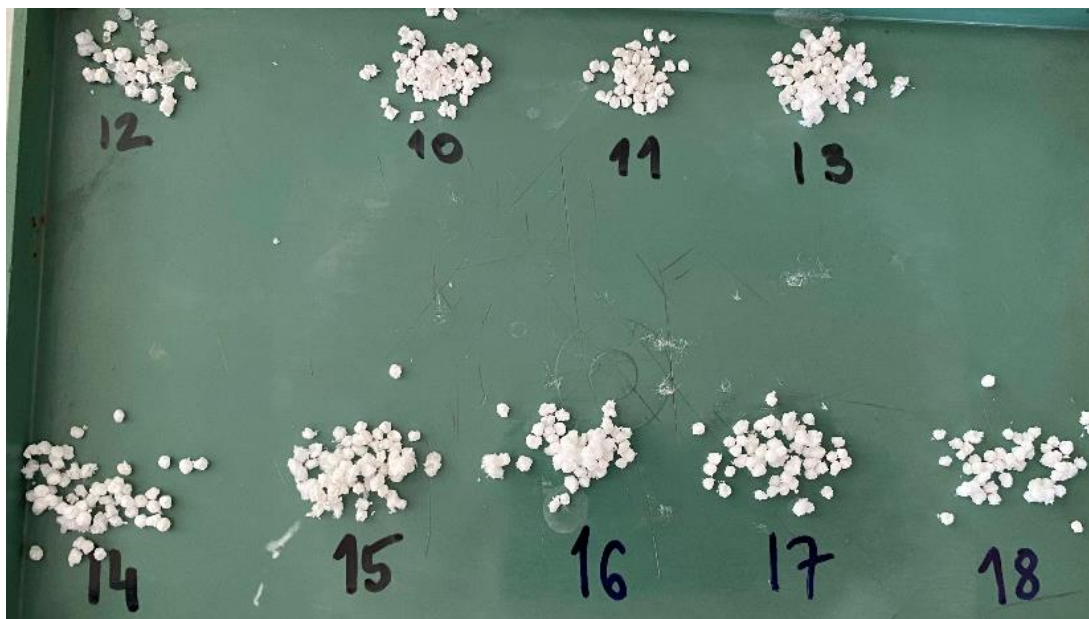
Izolacija eteričnog ulja iz kapsula (inkapsuliranog eteričnog ulja sjemenki komorača) izvedena je postupkom vodene destilacije, u aparaturi prema Clevengeru.

Pomoću analitičke vage odvaži se 1 g kapsula te se one prenesu u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 mL. Zatim se u tikvicu s uzorkom doda 100 mL destilirane vode i postavi se aparatura po Clevengeru u koju se doda destilirane vode. Uključi se protok vode i tikvica se kontinuirano zagrijava. Vrijeme provođenja destilacije je 2 h, a počinje se mjeriti od trenutka kada se kondenzira prva kap destilata u vodenom hladilu. Nakon završenog vremena destilacije, očita se volumen izdvojenog eteričnog ulja u graduiranom separatoru te se ono sakupi u vijalu. Kako bi se uklonio mogući ostatak vode, u vijalu s izdvojenim eteričnim uljem se doda bezvodnog natrijevog sulfata. U čistu vijalu se pipetom izdvoji eterično ulje i skladišti pri -18 °C radi provođenja daljnjih analiza.

3.2.4.3. Određivanje veličine i oblika kapsula

Veličina (eng. *bead size*) mokrih i suhih kapsula svakog uzorka se mjeri mikrometrom. Kapsule (10 kom) svakog uzorka se mjere u mokrom obliku, nakon inkapsulacije te nakon sušenja, na zraku ili nakon liofilizacije (slika 8). Mjeri se promjer kapsule na najdužem dijelu kapsule (d_{max})

i promjer kapsule okomit na d_{max} (d_{min}).



Slika 8. Liofilizirane kapsule prije mjerenja

Za svaki uzorak određene su prosječne vrijednosti d_{max} i d_{min} , iz kojih su onda izračunate prosječne vrijednosti promjera suhих i mokrih kapsula.

3.2.4.4. Određivanje faktora sferičnosti

Deformacija kapsula u odnosu na pravilan sferični oblik se računa i izražava kao faktor sferičnosti (eng. *sphericity factor*, SF).

Faktor sferičnosti se računa prema formuli koju su opisali Chan i sur. (2009) [4]:

$$SF = \frac{(d_{max}-d_{min})}{(d_{max}+d_{min})} \quad [4]$$

gdje je:

d_{max} = najdulji promjer (mm)

d_{min} = najkraći promjer okomit na najdulji promjer (mm)

3.2.4.5. Određivanje faktora skupljanja

Smanjenje u veličini kapsula poslije sušenja se izražava faktorom skupljanja (eng. *shrinkage factor*, k_{sf}) i računa se prema jednadžbi [5] (Chan i sur., 2011):

$$(k_{sf})_{(sušenje)} = \frac{(d_b - d_{b(suhe\ kapsule)})}{d_b} \quad [5]$$

gdje je:

d_b = prosjek promjera mokrih kapsula (mm)

$d_{b(suhe\ kapsule)}$ = prosjek promjera nakon sušenja (mm)

3.2.4.6. Bubrenje kapsula

Princip metode

Metoda određivanja bubrenja kapsula (eng. *beads swelling*) se temelji na mjerenju promjene mase kapsula nakon upijanja vode u određenim vremenskim intervalima.

Na analitičkoj vagi se izvaže 50 mg kapsula (sušenih na zraku) i 30 mg kapsula (liofiliziranih) i prebaci u plastične Falcon epruvete od 15 mL. Doda se 10 mL destilirane vode i zatvori plastičnim čepom. Od svakog uzorka pripremi se 8 epruveta koje se postave u vodenu kupelj s tresilicom na sobnu temperaturu i pod trešnjom od 100 rpm.

Svakih 20 min se izvadi po 1 epruveta od svakog uzorka, profiltrira filter papirom kroz stakleni lijevak i lagano pobriše staničevinom. Nabubrene kapsule se prebace u plastičnu posudicu za vaganje i izvažu na analitičkoj vagi.

Omjer bubrenja (eng. *swelling ratio*, M_t) se računa prema formuli (Lević i sur., 2015):

$$M(t) = \frac{(m_1 - m_2)}{m_2} \quad [6]$$

gdje je:

m_1 = masa kapsula nakon bubrenja (mg)

m_2 = masa kapsula prije bubrenja, u suhom obliku (mg)

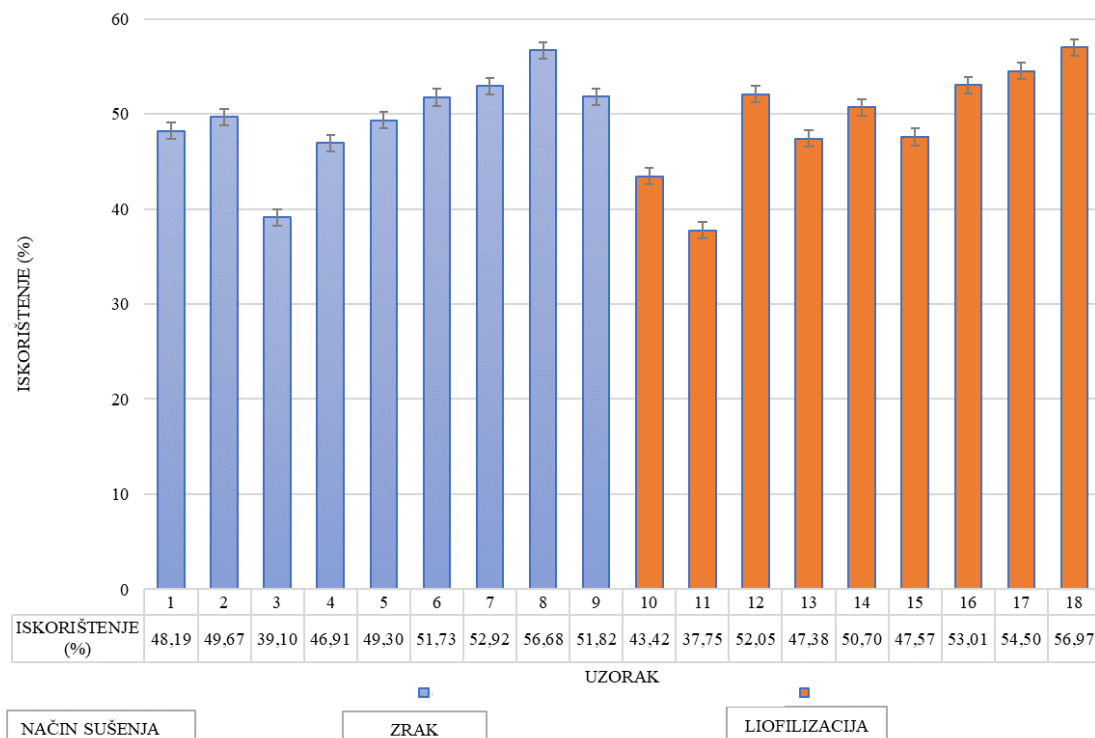
3.2.5. Obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijski dizajn na dvije (način sušenja kapsula) odnosno tri razine (udio alginata i proteina sirutke). Za statističku analizu primijenjena je multifaktorska analiza varijance uz Tukey HSD test, pri čemu je statistički značajna razlika razmatrana na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je optimirati udjele alginata, proteina sirutke i načina sušenja za iskorištenje postupka inkapsulacije eteričnog ulja sjemenki komorača postupkom elektrostatske ekstruzije i karakteristike dobivenih kapsula. Pripremljene su emulzije u kojima su varirani udjeli alginata i proteina sirutke te su primijenjena 2 načina sušenja dobivenih kapsula. Na taj način dobiveno je 18 uzoraka inkapsuliranog eteričnog ulja sjemenki komorača. Za svaki uzorak određeno je iskorištenje postupka inkapsulacije, učinkovitost inkapsulacije, kapacitet uklapanja, kao i veličina i oblik kapsula. Zatim je ispitano bubrenje kapsula rehidracijom u vodenom mediju. Statističkom analizom ispitane su razlike između uzoraka te je ispitan utjecaj dodatka različitih udjela alginata i proteina sirutke na karakteristike postupka inkapsulacije i karakteristike kapsula. Na kraju su određeni optimalni parametri za dobivanje kapsula najpoželjnijih karakteristika.

4.1. Iskorištenje postupka inkapsulacije



Slika 9. Iskorištenje postupka inkapsulacije

Rezultati iskorištenja postupka inkapsulacije eteričnog ulja sjemenki komorača (%) prikazani su na slici 9 gdje je vidljivo kako je iskorištenje postupka određeno u rasponu od 37,75 do 56,97 %, uz prosječnu vrijednost $49,43 \pm 0,87$ %. Najviše iskorištenje postupka je određeno u uzorku 18 (56,97 %), u kojem je udio alginata 2 % i udio proteina 1,5 % te je uzorak osušen liofilizacijom. Najniže iskorištenje postupka je zabilježeno u uzorku 11 (37,75 %) s udjelom alginata od 1 % i udjelom proteina od 0,75 % te pri sušenju liofilizacijom.

Pregledom dostupne literature ne postoje podaci o inkapsulaciji eteričnog ulja sjemenki komorača elektrostatskom ekstruzijom. No, Benavides i sur. (2016) prilikom inkapsulacije eteričnog ulja timijana postupkom ionskog geliranja dobili su viši raspon iskorištenja, koji je iznosio od 60,2 do 62,3 % s prosječnom vrijednosti od 61,2 %. Relativno niska iskorištenja dobivena u ovome radu mogu biti objašnjena tehničkim razlozima tj. gubitkom emulzije prilikom prijenosa između crijeva za emulziju i igle, kao i gubitaka tijekom kapanja i prijenosa emulzije.

Tablica 6. Utjecaj udjela alginata i proteina sirutke te načina sušenja na postupak inkapsulacije eteričnog ulja sjemenki komorača

Izvor varijacije	Iskorištenje (%)	Učinkovitost inkapsulacije (%)	Kapacitet uklapanja (%)
Udio alginata (%)	$p < 0,01^*$	$p < 0,01^*$	$p < 0,01^*$
1	$45,03 \pm 1,09^a$	$17,66 \pm 0,41^a$	$58,17 \pm 0,38^b$
1,5	$48,93 \pm 1,09^b$	$26,69 \pm 0,41^c$	$61,82 \pm 0,38^c$
2	$54,32 \pm 1,09^c$	$22,55 \pm 0,41^b$	$51,45 \pm 0,38^a$
Udio proteina sirutke (%)	$p = 0,68$	$p < 0,01^*$	$p < 0,01^*$
0	$48,64 \pm 1,09^a$	$18,38 \pm 0,41^a$	$53,03 \pm 0,38^a$
0,75	$49,76 \pm 1,09^a$	$22,16 \pm 0,41^b$	$55,91 \pm 0,38^b$
1	$49,87 \pm 1,09^a$	$26,37 \pm 0,41^c$	$62,49 \pm 0,38^c$
Način sušenja	-	$p < 0,01^*$	$p < 0,01^*$
Na zraku		$16,20 \pm 0,33^a$	$53,07 \pm 0,31^a$
Liofilizacija		$28,40 \pm 0,33^b$	$61,22 \pm 0,31^b$
Prosječna vrijednost	$49,43 \pm 0,87$	$22,30 \pm 2,01$	$57,14 \pm 2,13$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. $*p \leq 0,05$. Vrijednosti označene različitim slovima unutar jedne kućice međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Tablica 6 prikazuje rezultate statističke analize utjecaja alginata i proteina sirutke te načina sušenja na iskorištenje postupka inkapsulacije eteričnog ulja sjemenki komorača. Prema rezultatima statističke analize udio alginata ima značajan utjecaj na iskorištenje procesa, tako

što porastom udjela alginata dolazi i do povećanja iskorištenja procesa. Najveći porast iskorištenja procesa primjećuje se kod udjela alginata od 2 % ($54,32 \pm 1,09$ %), a najmanji pri udjelu alginata od 1 % ($45,03 \pm 1,09$ %). Udio proteina sirutke nema statistički značajnog utjecaja na iskorištenje procesa. Ukoliko promatramo iskorištenje, najveće vrijednosti su dobivene pri udjelu alginata od 2 %, a kako nema statistički značajnog utjecaja udjela proteina na iskorištenje, zbog financijskog parametra i smanjenja troškova, izostanak proteina sirutke je optimalan.

4.2. Učinkovitost inkapsulacije i kapacitet uklapanja

Tablica 7. Učinkovitost inkapsulacije i kapacitet uklapanja

UZORAK	UČINKOVITOST INKAPSULACIJE (%)	KAPACITET UKLAPANJA (%)
1	15,46	61,27
2	18,01	64,69
3	16,85	63,08
4	16,82	53,13
5	18,91	56,47
6	15,92	51,65
7	13,05	39,63
8	13,45	42,01
9	16,69	45,80
10	6,16	37,88
11	6,45	39,54
12	42,78	82,60
13	27,58	65,17
14	51,95	78,28
15	29,00	66,31
16	31,04	61,18
17	23,94	54,55
18	36,61	65,57
Prosječna vrijednost	22,30 ± 2,01	57,14 ± 2,13

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti ± standardna devijacija.

Rezultati učinkovitosti postupka inkapsulacije eteričnog ulja sjemenki komorača (%) su prikazani u tablici 7, gdje je vidljivo da je učinkovitost određena u rasponu od 6,16 do 51,95 %, dok je prosječna vrijednost $22,30 \pm 2,01$ %. Najviša učinkovitost je određena u uzorku 14 (51,95

%) s udjelom alginata od 1,5 % i udjelom proteina 0,75 % te nakon sušenja liofilizacijom. S druge strane, najniža učinkovitost je zabilježena kod uzorka 10 (6,16 %) u kojem je udio alginata 1 % i bez dodatka proteina te nakon sušenja liofilizacijom.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju se slažu s onima iz istraživanja Sangsuwan i Sutthasupa (2019) koji su inkapsulirali eterična ulja klinčića, lavande i ružmarina ionskim geliranjem korištenjem kitozana i alginata. Učinkovitost inkapsulacije eteričnih ulja u kapsulama kitozana bila je znatno niža (4,91-12,80 %) od rezultata dobivenih za inkapsulaciju s alginskom kiselom gdje se učinkovitost kreće od 17,78 do 60,41 %. Primijetili su i kako povećanjem udjela eteričnog ulja dolazi do pada učinkovitosti inkapsulacije, što se objašnjava zasićenjem kapsula uklapanjem eteričnih ulja.

Benavides i sur. (2016) su također uočili kako dolazi do smanjivanja učinkovitosti inkapsulacije povećanjem udjela eteričnog ulja, što se može objasniti ograničenom mogućnošću kapsule da sadrži ulje. Kako se povećava udio eteričnog ulja, značajna količina je blizu površine kapsule te prilikom sušenja kapsula dolazi do hlapljenja eteričnog ulja čime se smanjuje učinkovitost inkapsulacije. Međutim, Benavides i sur. (2016) navode kako su optimalni uvjeti za inkapsulaciju 1 % udio alginata, 2 % udio eteričnog ulja te se u tim uvjetima postiže učinkovitost inkapsulacije eteričnog ulja timijana od 85 %. U ovom istraživanju korišteno je 5 % eteričnog ulja sjemenki komorača te se time može objasniti niža učinkovitost postupka inkapsulacije od onih navedenih u literaturi.

Prema rezultatima statističke analize prikazanim u tablici 6, sva tri ispitivana parametra (udio alginata, udio proteina sirutke i način sušenja) imaju značajan utjecaj na učinkovitost inkapsulacije. Rezultati upućuju na to da postoji statistički značajna razlika u učinkovitosti inkapsulacije obzirom na udio alginata. Udio alginata od 1,5 % dovodi do najveće učinkovitosti postupka inkapsulacije ($26,69 \pm 0,41\%$), dok udio alginata od 1 % dovodi do najmanje učinkovitosti inkapsulacije ($17,66 \pm 0,41\%$).

Također, postoji statistički značajna razlika između udjela proteina sirutke i učinkovitosti inkapsulacije. Najviši udio proteina sirutke (1 %) dovodi do najveće učinkovitosti inkapsulacije ($26,37 \pm 0,41\%$), dok izostanak proteina sirutke uzrokuje najnižu vrijednost učinkovitosti inkapsulacije ($18,38 \pm 0,41\%$).

Iz prikazanih rezultata je vidljivo kako liofilizacija ima značajno veći utjecaj na učinkovitost postupka inkapsulacije od sušenja na zraku.

Mehta i sur. (2022) ističu da se kapsule dobivene elektrostatskom ekstruzijom mogu sušiti,

primjerice liofilizacijom, što dovodi do poroznosti strukture kapsule, snižavanja učinkovitosti inkapsulacije i slabije zaštite jezgre kapsule. Međutim u ovom istraživanju to se može primijeniti samo na uzorke 10 i 11 koji imaju najniži udio alginata i bez dodatka proteina, a sušene su liofilizacijom, dok ostali uzorci sušeni liofilizacijom imaju veću učinkovitost inkapsulacije.

Yilmaztekin i sur. (2019) provodili su inkapsulaciju eteričnog ulja peperminta elektrostatskom ekstruzijom uz Ca-alginat, želatinu/alginat i karnauba vosak kao nosače. Najveću učinkovitost inkapsulacije prikazuje Ca-alginat ($98,4 \pm 4,3$ %), zatim karnauba vosak ($94,2 \pm 7,8$ %), dok želatina/alginat nosač prikazuje najnižu učinkovitost inkapsulacije ($13,2 \pm 1,2$ %). Iz navedenog je vidljivo kako rezultati dobiveni u ovom istraživanju su najbliži onima dobivenima kod korištenja želatine/alginata kao nosača. Velike razlike između rezultata dobivenih u ovome istraživanju, i onih prisutnih u literaturi se mogu objasniti odbojnim silama između hidrofilnih nosača i eteričnog ulja kao i kompleksnoj strukturi eteričnog ulja komorača.

U istraživanju kojeg su proveli Volić i sur. (2018) učinkovitost inkapsulacije se kretala u rasponu 75-89 %, ovisno o različitim udjelima alginata i proteina soje, pri čemu je kod korištenja alginata bez proteina soje dobivena učinkovitost od 72 %. Navedeni rezultati se slažu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, gdje je vidljivo kako uzorci 1, 4, 7, 10, 13 i 16, koji su dobiveni bez dodatka proteina sirutke, prikazuju trend nižih vrijednosti učinkovitosti inkapsulacije od uzoraka koji u svom sastavu imaju određeni udio proteina sirutke. Volić i sur. (2018) to objašnjavaju činjenicom da se alginatnim kapsulama pripisuje visoka poroznost, što uzorkuje curenje jezgre i difuziju inkapsuliranog materijala u omotač gela ili u vodeni medij. Kako bi se to izbjeglo, predlažu korištenje ostalih polimera (poput kitozana) u kombinaciji s alginatom. Međutim, navode kako učinkovitost inkapsulacije ne ovisi isključivo o koncentracijama alginata i proteina soje.

Soliman i sur. (2013) su u provedenom istraživanju kod učinkovitosti inkapsulacije eteričnih ulja cimeta, klinčića i timijana, uočili kako učinkovitost raste od 70-80 % pri upotrebi 1 % alginata do 90 % kod dodatka 2 % alginata. To objašnjavaju tako što povećanjem udjela alginata dolazi do nastanka gustih i zbijenih struktura s porama koje zarobe kapljice eteričnog ulja. Međutim rezultati istraživanja prikazani u ovome radu ne prikazuju trend porasta učinkovitosti inkapsulacije povećanjem koncentracije alginata, zbog pretpostavke kako su dodani proteini zauzeli slobodni prostor u polimernom matriksu koji je predviđen za ulje.

Gledajući učinkovitost inkapsulacije udio alginata od 1,5 %, udio proteina od 1 %, te sušenje liofilizacijom prikazuju najveće vrijednosti te se navedeni uvjeti mogu smatrati optimalnima.

Tablica 7 prikazuje kapacitet uklapanja eteričnog ulja sjemenki komorača (%). Iz prikazanog je vidljivo kako se kapacitet uklapanja kreće u rasponu 37,88 do 82,60 %, a prosječna vrijednost iznosi $57,14 \pm 2,13$ %. Najviši kapacitet uklapanja je određen u uzorku 12 (82,60 %) s 1 % alginata, 1,5 % proteina i nakon postupka sušenja liofilizacijom. Najniža vrijednost kapaciteta uklapanja određena je u uzorku 10 (37,88 %) s 1 % alginata i bez dodatka proteina te nakon postupka sušenja liofilizacijom.

Dobiveni rezultati su u skladu s onima dobivenim u istraživanju kojeg su proveli Gallo i sur. (2020) na inkapsulaciji eteričnog ulja origana ionskim geliranjem, uz dodatak proteina sirutke, gdje se kapacitet uklapanja kretao od $64,19 \pm 0,017$ do $78 \pm 0,017$ %. Mokre kapsule, dobivene ionskim geliranjem, prekrivene proteinima sirutke prikazale su najviši kapacitet uklapanja ($78 \pm 0,017$ %), dok one dobivene ionskim geliranjem, bez proteina sirutke i liofilizirane su pokazale najnižu vrijednost kapaciteta uklapanja ($64,19 \pm 0,017$ %). Rezultati pokazuju kako oblaganje alginatnih kapsula s proteinima sirutke i njihovim elektrostatskim interakcijama povećava izvedba inkapsulacije. Dok s druge strane, u njihovom istraživanju, liofilizacija je imala suprotan učinak. Uzorci s i bez dodanih proteina imali su značajno manji kapacitet uklapanja nakon liofilizacije. Moguće objašnjenje je gubitak hlapljivih tvari zajedno s vodom prilikom procesa liofilizacije, što nije primijećeno u ovom istraživanju.

Prema dobivenim rezultatima statističke analize, vidljivo je kako sva tri ispitivana parametra (udio alginata, udio proteina sirutke i način sušenja) značajno utječu na kapacitet uklapanja (tablica 6). Najveća vrijednost kapaciteta uklapanja zabilježena je pri udjelu alginata od 1,5 % ($61,82 \pm 0,38$ %), dok udio od 2 % daje najnižu vrijednost ($51,45 \pm 0,38$ %).

Također vidljivo je da udio proteina sirutke značajno utječe na učinkovitost inkapsulacije, pri čemu udio od 1 % osigurava najveći kapacitet uklapanja ($62,49 \pm 0,38$ %), dok su izostankom proteina sirutke dobivene najniže vrijednosti kapaciteta uklapanja ($53,03 \pm 0,38$ %). Prikazani rezultati ukazuju kako postupak liofilizacije značajno utječe na povećanje kapaciteta uklapanja ($61,22 \pm 0,31$ %) u odnosu na rezultate dobivene nakon sušenja na zraku ($53,07 \pm 0,31$ %). Dobiveni rezultati nisu u skladu s rezultatima prikazanim u literaturi, međutim, prilikom liofilizacije korišteni su drugačiji uvjeti i više temperature.

Benavides i sur. (2016) navode kako su optimalni uvjeti za inkapsulaciju 1 % udio alginata, 2 % udio eteričnog ulja, pošto se u tim uvjetima može uklopiti više od 50 % eteričnog ulja timijana. Najbolji rezultati su primijećeni kod udjela ulja od 2 %, i tada je kapacitet uklapanja iznosio > 85 %. Navode kako su ranija istraživanja pokazala učinkovitost od 83,8 %, međutim postupak

je zahtijevao korištenje emulgatora kako bi se postiglo zadržavanje ulja.

Gledajući najveće dobivene vrijednosti kapaciteta uklapanja, udio alginata od 1,5 %, proteina od 1 % i uz liofilizaciju kao način sušenja, mogu se smatrati kao optimalni uvjeti za kapacitet uklapanja.

4.3. Veličina i oblik kapsula

Tablica 8. Veličina mokrih i suhih kapsula

UZORAK	Veličina mokrih kapsula (mm)		Veličina suhih kapsula (mm)		Prosječna vrijednost veličine mokrih kapsula (mm)	Prosječna vrijednost veličine suhih kapsula (mm)
	d_{max}	d_{min}	d_{max}	d_{min}		
1	2,97 ± 0,21	2,66 ± 0,17	2,04 ± 0,10	1,70 ± 0,26	2,82 ± 0,25	1,87 ± 0,26
2	3,38 ± 0,19	3,07 ± 0,14	1,99 ± 0,13	1,47 ± 0,17	3,23 ± 0,23	1,73 ± 0,30
3	3,25 ± 0,13	3,01 ± 0,15	1,92 ± 0,09	1,54 ± 0,28	3,13 ± 0,18	1,73 ± 0,28
4	3,24 ± 0,20	2,84 ± 0,23	1,83 ± 0,12	1,35 ± 0,22	3,04 ± 0,29	1,59 ± 0,30
5	3,43 ± 0,14	3,20 ± 0,14	1,97 ± 0,10	1,38 ± 0,25	3,31 ± 0,18	1,67 ± 0,35
6	3,57 ± 0,23	3,20 ± 0,13	1,83 ± 0,05	1,18 ± 0,12	3,38 ± 0,26	1,50 ± 0,35
7	3,44 ± 0,20	3,07 ± 0,18	1,74 ± 0,15	1,36 ± 0,08	3,25 ± 0,26	1,55 ± 0,23
8	3,42 ± 0,21	3,04 ± 0,14	1,71 ± 0,11	1,51 ± 0,10	3,23 ± 0,26	1,61 ± 0,15
9	3,40 ± 0,13	3,21 ± 0,19	1,73 ± 0,11	1,51 ± 0,08	3,31 ± 0,18	1,62 ± 0,15
10	3,00 ± 0,25	2,50 ± 0,23	2,70 ± 0,37	1,88 ± 0,23	2,75 ± 0,35	2,29 ± 0,52
11	3,17 ± 0,10	2,88 ± 0,18	2,65 ± 0,33	1,99 ± 0,11	3,02 ± 0,21	2,32 ± 0,42
12	3,10 ± 0,05	2,93 ± 0,17	2,75 ± 0,21	2,24 ± 0,32	3,01 ± 0,15	2,50 ± 0,37
13	3,17 ± 0,08	2,96 ± 0,10	2,59 ± 0,27	2,07 ± 0,25	3,06 ± 0,14	2,33 ± 0,37
14	3,32 ± 0,35	2,97 ± 0,18	2,71 ± 0,24	2,29 ± 0,26	3,15 ± 0,32	2,50 ± 0,33
15	3,32 ± 0,19	2,93 ± 0,22	2,43 ± 0,26	2,02 ± 0,27	3,13 ± 0,28	2,22 ± 0,33
16	3,63 ± 0,16	3,27 ± 0,15	2,52 ± 0,11	1,88 ± 0,06	3,45 ± 0,24	2,20 ± 0,34
17	3,44 ± 0,16	3,08 ± 0,21	2,65 ± 0,35	1,96 ± 0,24	3,26 ± 0,26	2,31 ± 0,46
18	3,67 ± 0,19	3,39 ± 0,24	2,62 ± 0,19	2,03 ± 0,24	3,53 ± 0,25	2,33 ± 0,37
	Prosječna vrijednost				3,17 ± 0,20	1,99 ± 0,36

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti ± standardna devijacija.

Veličine mokrih i suhih kapsula prikazane su u tablici 8 gdje je vidljivo kako se promjeri d_{max} mokrih kapsula kreću u rasponu od $2,97 ± 0,21$ do $3,67 ± 0,19$ mm. Najviša vrijednost d_{max} mokrih kapsula je određena u uzorku 18 ($3,67 ± 0,19$ mm), u kojemu je udio alginata 2 %, proteina 1,5 % te su kapsule sušene liofilizacijom. Najniža vrijednost d_{max} mokrih kapsula

određena je u uzorku 1 ($2,97 \pm 0,21$ mm) s udjelom alginata od 1 % i bez dodatka proteina te načinom sušenja uzorka na zraku. Dobivene vrijednosti su više od onih zabilježenih u istraživanju koje su proveli Volić i sur. (2018) pri inkapsulaciji eteričnog ulja timijana elektrostatskom ekstruzijom, koristeći alginat i proteine soje kao nosače. U njihovom istraživanju d_{\max} mokrih kapsula određen je u rasponu od 1,295 do 2,016 mm, gdje je najveći promjer zabilježen pri najvećem udjelu proteina.

Promjeri d_{\min} mokrih kapsula varirali su od $2,50 \pm 0,23$ do $3,39 \pm 0,24$ mm. Najviša vrijednost d_{\min} mokrih kapsula je određena u uzorku 18 ($3,39 \pm 0,24$ mm), u kojemu je udio alginata 2 %, proteina 1,5 % te su kapsule sušene liofilizacijom. Najniža vrijednost d_{\min} mokrih kapsula je određena u uzorku 10 ($2,50 \pm 0,23$ mm), u kojemu je udio alginata 1 %, bez prisustva proteina i sušene su liofilizacijom. Dobivene vrijednosti su dvostruko više od onih dobivenih u istraživanju Volić i sur. (2018) gdje je d_{\min} mokrih kapsula određen u rasponu od 1,250 do 1,631 mm.

Promjeri d_{\max} suhih kapsula određeni su u rasponu od $1,71 \pm 0,11$ do $2,75 \pm 0,21$ mm. Najviša vrijednosti d_{\max} suhih kapsula je određena u uzorku 12 ($2,75 \pm 0,21$ mm), sastava 1 % udjela alginata i 1,5 % udjela proteina te načina sušenja liofilizacijom. Najniža vrijednost d_{\max} suhih kapsula određena je u uzorku 8 ($1,71 \pm 0,11$ mm), s 2 % udjela alginata i 0,75 % udjela proteina te načinom sušenja na zraku. Dobivene vrijednosti su također dvostruko više od vrijednosti koje su prikazali Volić i sur. (2018) u svome radu, gdje je d_{\max} suhih kapsula iznosio od 0,623 do 1,880 mm.

Promjeri d_{\min} suhih kapsula varirali su od $1,18 \pm 0,12$ do $2,29 \pm 0,26$ mm, što su dvostruko više vrijednosti od onih prikazane u radu Volić i sur. (2018), gdje je d_{\min} suhih kapsula u rasponu od 0,550 do 0,923 mm. Najviša vrijednost d_{\min} suhih kapsula određena je u uzorku 14 ($2,29 \pm 0,26$ mm), u čijem sastavu je 1,5 % udio alginata i 0,75 % udio proteina te liofilizacijom kao načinom sušenja. Najniža vrijednost d_{\min} suhih kapsula određena je u uzorku 6 ($1,18 \pm 0,12$ mm), u kojemu je udio alginata i proteina 1,5 % te su kapsule sušene na zraku.

Nadalje, vidljivo je kako je prosječna vrijednost veličina mokrih kapsula određena u rasponu od $2,75 \pm 0,35$ do $3,53 \pm 0,25$ mm. U prosjeku, u uzorku 14 ($3,53 \pm 0,25$ mm), u čijem sastavu je 1,5 % udio alginata i 0,75 % udio proteina, te je liofilizacija kao način sušenja, su dobivene kapsule najveće veličine. Dok su u uzorku 10 ($2,75 \pm 0,35$ mm), u kojemu je udio alginata 1 %, bez prisustva proteina i načina sušenja liofilizacijom, dobivene kapsule najmanje veličine.

U prosjeku, dobivene vrijednosti veličine mokrih kapsula su $3,17 \pm 0,20$ mm, a veličine suhih kapsula $1,99 \pm 0,36$ mm. Dobivene vrijednosti su u skladu s rezultatima koje su dobili

Sangsuwan i Sutthasupa (2019) pri inkapsulaciji eteričnog ulja klinčića, lavande i ružmarina ionskim geliranjem korištenjem kitozana i alginata. Suhe kapsule kitozana bile su nejednakih veličina, sferičnog oblika promjera $0,6 \pm 0,1$ mm, dok suhe kapsule alginata su imale više sferičan oblik promjera $2,5 \pm 0,3$ mm. Volić i sur. (2018) u svome radu kod inkapsulacije eteričnog ulja timijana kombinacijom alginata i proteina soje kao nosača, navode kako se promjer mokrih kapsula se kreće od 1,3 do 2,4 mm, a promjer suhih kapsula 0,6 do 1,4 mm.

Benavides i sur. (2016) su pri inkapsulaciji eteričnog ulja timijana postupkom ionskog geliranja, uz alginat kao nosač u udjelu od 1 % dobili prosječan promjer mokrih kapsula od 0,890 mm, što je dvostruko manja vrijednost od one dobivene u ovom istraživanju.

Kokina i sur. (2019) elektrostatskom ekstruzijom su inkapsulirali eterična ulja lavande, bergamota, čajevca i pepermintu koristeći 2 % natrijevog alginata te su uzorke sušili liofilizacijom. Rezultati njihovog istraživanja prikazuju kako su promjeri mokrih kapsula lavande, bergamota, čajevca i pepermintu iznosili redom: $1,51 \pm 0,07$, $1,6 \pm 0,9$, $1,58 \pm 0,08$ i $1,46 \pm 0,09$ mm, što su niže vrijednosti od onih dobivenih u ovome radu. Nadalje, promjeri suhih kapsula su bili: $1,4 \pm 0,2$, $1,6 \pm 0,9$, $1,58 \pm 0,08$ i $1,46 \pm 0,09$ mm, što su slične vrijednosti dobivene u ovome radu.

Sangsuwan i Sutthasupa (2019) u istraživanju pri inkapsulaciji eteričnog ulja klinčića, lavande i ružmarina ionskim geliranjem korištenjem kitozana i alginata. Suhe kapsule kitozana bile su nejednakih veličina, sferičnog oblika promjera $0,6 \pm 0,1$ mm, dok suhe kapsule alginata imale više sferičan oblik promjera $2,5 \pm 0,3$ mm, što se podudara s vrijednostima dobivenim u ovome radu.

4.4. Faktor sferičnosti i faktor skupljanja

Tablica 9. Faktor sferičnosti mokrih i suhih kapsula te faktor skupljanja

UZORAK	FAKTOR SFERIČNOSTI MOKRIH KAPSULA	FAKTOR SFERIČNOSTI SUHIH KAPSULA	FAKTOR SKUPLJANJA
1	0,06	0,09	0,34
2	0,05	0,15	0,46
3	0,04	0,11	0,45
4	0,07	0,15	0,48
5	0,03	0,17	0,50
6	0,05	0,22	0,55
7	0,06	0,12	0,52
8	0,06	0,06	0,50
9	0,03	0,07	0,51
10	0,09	0,18	0,17
11	0,05	0,14	0,23
12	0,03	0,10	0,17
13	0,03	0,11	0,24
14	0,05	0,08	0,20
15	0,06	0,09	0,29
16	0,05	0,14	0,36
17	0,06	0,15	0,29
18	0,04	0,13	0,34
Prosječna vrijednost	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,37 ± 0,02

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti ± standardna devijacija.

Iz podataka dostupnih u literaturi, smatra se da ako je faktor sferičnosti $SF \leq 0,05$ kapsula je sferičnog oblika, dok sve više vrijednosti označavaju veći razmjer iskrivljenja kapsula. Faktor sferičnosti se koristi za određivanje odstupanja od sferičnog oblika kapsula. Vrijednost 0 označava idealnu sferu, dok povećanje vrijednosti znači više deformacija u obliku kapsule (Kokina i sur., 2019; Benavides i sur., 2016).

U tablici 9 prikazane su dobivene vrijednosti faktora sferičnosti mokrih i suhih kapsula te faktor skupljanja. Vidljivo je kako je faktor sferičnosti mokrih kapsula određen u rasponu od 0,03 do 0,09 te je prosječna vrijednost svih uzoraka mokrih kapsula 0,05, što znači da su u prosjeku, mokre kapsule sferičnog oblika. Najveća vrijednost faktora sferičnosti mokrih kapsula dobivena je u uzorku 10 (0,09), dok najnižu vrijednost faktora sferičnosti mokrih kapsula imaju uzorci 5, 9, 12 i 13 (0,03). Sferičan oblik mokrih kapsula prikazuju uzorci: 2, 3, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 16

i 18.

Yilmaztekin i sur. (2019) pri inkapsulaciji eteričnog ulja pepermintna elektrostatskom ekstruzijom primjećuju kako su mokre kapsule Ca-alginata sferičnog oblika te kako uslijed liofilizacije dolazi do značajnog skupljanja kapsule, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

Kokina i sur. (2019) u svome istraživanju navode kako bez obzira na korišteno eterično ulje, mokre kapsule su imale karakterističan ovalan oblik koji se znatno razlikuje od idealnog sferičnog oblika, što nije u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju. Faktor sferičnosti mokrih kapsula inkapsuliranih eteričnih ulja lavande, bergamota, čajevca i pepermintna iznosio je redom: 0,241; 0,294; 0,238 i 0,225.

U istraživanju Benavides i sur. (2016) svi uzorci mokrih kapsula bili ovalnog, a ne sferičnog oblika, što se znatno razlikuje od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Također su uočili kako povećanje udjela eteričnog ulja od 1 do 3 % značajno utječe na gubitak sferičnosti kapsula.

Volić i sur. (2018.) inkapsulacijom eteričnog ulja timijana elektrostatskom ekstruzijom uz alginat i proteine soje kao nosače prikazuju da su faktori sferičnosti mokrih kapsula iznosili od 0,001 (alginat 1,5 % i bez proteina soje) do 0,282 (kod alginata od 2,5 % i proteina soje 1,5 %), što su veće vrijednosti nego one dobivene u ovom istraživanju.

Tablica 10. Utjecaj udjela alginata i proteina sirutke te načina sušenja na karakteristike inkapsuliranog eteričnog ulja komorača

Izvor varijacije	Faktor sferičnosti mokrih kapsula	Faktor sferičnosti suhih kapsula	Faktor skupljanja
Udio alginata (%)	p = 0,80	p < 0,01*	p < 0,01*
1	0,05 ± 0,00 ^a	0,13 ± 0,00 ^b	0,30 ± 0,00 ^a
1,5	0,05 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^c	0,38 ± 0,00 ^b
2	0,05 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,00 ^a	0,42 ± 0,00 ^c
Udio proteina sirutke (%)	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*
0	0,06 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^c	0,35 ± 0,00 ^a
0,75	0,05 ± 0,00 ^{a,b}	0,13 ± 0,00 ^b	0,36 ± 0,00 ^b
1	0,04 ± 0,00 ^a	0,12 ± 0,00 ^a	0,39 ± 0,00 ^c
Način sušenja	-	p = 0,21	p < 0,01*
Na zraku		0,13 ± 0,00 ^a	0,45 ± 0,00 ^b
Liofilizacija		0,13 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,00 ^a
Prosječna vrijednost	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,37 ± 0,02

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. *p ≤ 0,05. Vrijednosti označene različitim slovima unutar jedne kućice međusobno se statistički razlikuju na p ≤ 0,05.

Tablica 10 prikazuje rezultati statističke analize utjecaja udjela alginata, proteina sirutke te načina sušenja na faktor sferičnosti mokrih kapsula eteričnog ulja komorača. Prema rezultatima statističke analize udio alginata statistički značajno ne utječe na faktor sferičnosti mokrih kapsula, dok udio proteina sirutke ima značajan utjecaj na faktor sferičnosti mokrih kapsula. Najviše vrijednosti faktora sferičnosti mokrih kapsula su dobivene bez dodatka proteina ($0,06 \pm 0,00$), dok su dodatkom proteina od 1 % dobivene najniže vrijednosti ($0,04 \pm 0,00$). Dobiveni rezultati se razlikuju od rezultata dobivenih u istraživanju Volić i sur. (2018) gdje je određen optimalan udio alginata od 1,5 %, pri čemu se dobivaju sferične kapsule, dok daljnje dodavanje alginata dovodi do povećane deformacije kapsula uslijed porasta viskoznosti.

Lević i sur. (2015) su u provedenom istraživanju pri inkapsulaciji D-limonena koristeći alginat kao nosač, zaključili kako postoji statistički značajan porast u promjeru kapsula prilikom povećanja udjela alginata. To objašnjavaju kao posljedicu povećane viskoznosti više koncentriranih Na-alginat emulzija. Navode kako izgleda da povećanje viskoznosti dovodi do smanjenja jednolikosti kapsula. Primijećeno je kako ekstruzijom visoko viskoznih polimernih otopina dolazi do proizvodnje kapsula oblika jajeta ili kapljica, što objašnjavaju ponašanjem polimera u elektrostatskom polju, gdje kao rezultat primijenjenog napona, sferični oblik tekućeg meniska na vrhu igle je deformiran u stožasti oblik, što je izraženije kod alginata većih viskoznosti (većih koncentracija). Kada se takva stožasta kapljica odvoji od igle, i dođe u dodir za otopinom CaCl_2 , stvrdne se u obliku izdužene kapsule. Također, primijetili su da nakon sušenja dolazi do promjene oblika kapsula prema nepravilnim oblicima, što je vidljivo prema faktoru sferičnosti koji je viši od 0,05.

Dobiveni rezultati statističke analize prikazuju kako udio proteina sirutke značajno utječe na faktor sferičnosti mokrih kapsula (tablica 10). Najveći je bez prisustva proteina, dok je najmanji pri udjelu od 1% što upućuje da pri većem udjelu proteina, kapsule imaju sferičniji oblik. Utjecaj proteina soje na veličinu kapsula, potvrđeno je u istraživanju koje su proveli Volić i sur. (2018) u kojemu je došlo do statistički značajnog smanjenja u veličini kapsula kod istih koncentracija alginata. Moguće objašnjenje je to što denaturirani i odmotani proteini soje se također mogu unakrsno povezivati s Ca^{2+} ionima, čineći jezgru čvršćom pošto je prisutno više proteina, što se može primijeniti i u slučaju proteina sirutke

Prema kriteriju faktora sferičnosti mokrih kapsula, kako udio alginata značajno ne utječe na faktor sferičnosti mokrih kapsula, zbog financijskog aspekta i smanjenja troškova je optimalno odabrati udio od 1,0 % alginata. te udio od 1,0 % proteina sirutke.

Faktor sferičnosti suhих kapsula određen je u rasponu od 0,06 do 0,22 te je prosječna vrijednost faktora sferičnosti suhих kapsula $0,13 \pm 0,01$. Najveća vrijednost faktora sferičnosti suhих kapsula je dobivena u uzorku 6 (0,22), dok je u uzorku 8 dobivena najniža vrijednost (0,06). Dobiveni rezultati prikazuju kako sušenjem dolazi do gubitka sferičnosti kapsula te niti jedan uzorak suhих kapsula nije sferičnog oblika.

Kokina i sur. (2019) prikazuju kako je faktor sferičnosti suhих kapsula inkapsuliranih eteričnih ulja lavande, bergamota, čajevca i pepermintaa iznosio redom: 0,521; 0,407; 0,541 i 0,402, što se razlikuje od podataka dobivenih u ovom istraživanju. Razlike se mogu objasniti brzinom toka emulzije, korištenog napona sistema, svojstvima inkapsuliranog spoja i promjeru korištene igle. Prema rezultatima statističke analize iz tablice 10, na faktor sferičnosti suhих kapsula značajno utječu udio alginata i proteina sirutke, dok način sušenja kapsula, nema značajnog utjecaja na faktor sferičnosti suhих kapsula. Udio alginata od 1,5 % daje značajno više vrijednosti faktora sferičnosti suhих kapsula ($0,14 \pm 0,00$), dok dodatak 2 % alginata daje značajno niže vrijednosti ($0,11 \pm 0,00$). Dok u slučaju dodatka proteina sirutke, više vrijednosti faktora sferičnosti suhих kapsula dobivene su pri manjem udjelu proteina.

Kokina i sur. (2019) su također primijetili da kod uzoraka koje su sušili liofilizacijom dolazi do deformiranja kapsula i faktor sferičnosti je veći od 0,2, što se u ovom istraživanju može primijetiti samo u uzorku 6. Znatno povećanje faktora sferičnosti Kokina i sur. (2019) objašnjavaju tako što tijekom liofilizacije dolazi do povećanja volumena vode uslijed kristalizacije, što dovodi do stvaranje porozne površine kapsula i puknuća površine.

Volić i sur. (2018.) navode puno veći raspon faktora sferičnosti suhих kapsula eteričnog ulja timijana dobivenih inkapsulacijom elektrostatskom ekstruzijom uz alginat i proteine soje kao nosa, te uz sušenjem na zraku. Faktor sferičnosti suhих kapsula u njihovom istraživanju se kretao od 0,038 (1,5 % alginata i bez proteina soje) do 0,504 (2,5 % alginata i 2,5 % proteina soje).

Gledajući faktor sferičnosti suhих kapsula, udio alginata od 2,0 % te udio proteina sirutke od 1,0 % prikazuju najpovoljnije rezultate pa se navedeni uvjeti mogu smatrati optimalnima. Dok nema značajnog utjecaja načina sušenja na faktor sferičnosti suhих kapsula, zbog financijskog aspekta i smanjenja troškova, optimalan uvjet je sušenje na zraku.

Tablica 9 također prikazuje rezultate faktora skupljanja, čije vrijednosti iznose od 0,17 do 0,55. Najviša vrijednost faktora skupljanja određena je u uzorku 6 (0,55), dok je u uzorcima 10 i 12 određena najniža vrijednost (0,17). Prosječna vrijednost iznosila je $0,37 \pm 0,02$. Dobiveni rezultati su slični onima koje su dobili Kokina i sur. (2019) gdje je nakon sušenja liofilizacijom

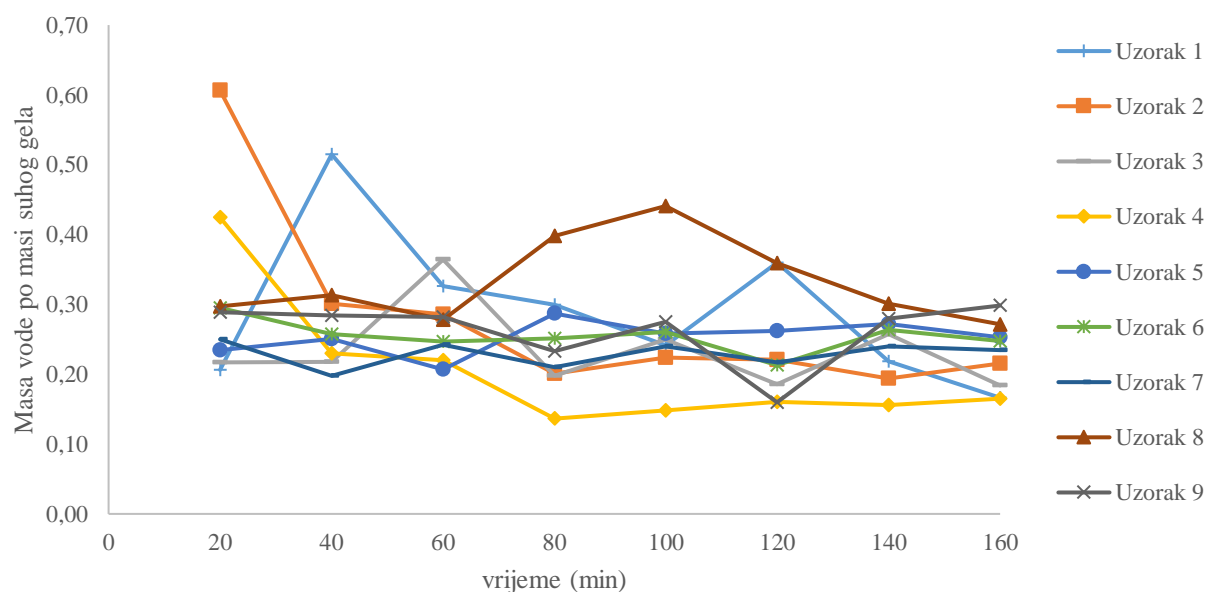
kapsula, faktor skupljanja je iznosio kod eteričnog ulja lavande: 0,397, bergamota 0,367, čajevca 0,331 i pepermintina 0,348. Lević i sur. (2015) su primijetili da kod dodatka arome, dolazi do manjeg skupljanja kapsula što objašnjavaju time da što je više arome prisutno, to je manje vode koja može ispariti.

Sva tri ispitivana parametra (udio alginata, proteina sirutke i način sušenja) imaju statistički značajan utjecaj na faktor skupljanja (tablica 10). Rezultati prikazuju kako porastom udjela i alginata i proteina sirutke se značajno povećava vrijednost faktora skupljanja, dok su značajno niže vrijednosti dobivene s udjelom alginata od 1 % i bez prisustva proteina sirutke. Najviše vrijednosti su dobivene kod udjela alginata od 2 % ($0,42 \pm 0,00$), a najniže kod udjela od 1 % ($0,30 \pm 0,00$). Izostanak proteina sirutke daje najnižu vrijednost ($0,35 \pm 0,00$), dok je najviša pri udjelu od 1 % ($0,39 \pm 0,00$).

Također, postoji značajan utjecaj načina sušenja na faktor skupljanja te dobiveni rezultati prikazuju kako je faktor skupljanja veći kod sušenja na zraku nego pri liofilizaciji.

Gledajući faktor skupljanja, udio alginata od 1,0 % te izostanak proteina sirutke pokazuju najbolje rezultate te se uz sušenje liofilizacijom dobivaju optimalni uvjeti.

4.5. Bubrenje kapsula



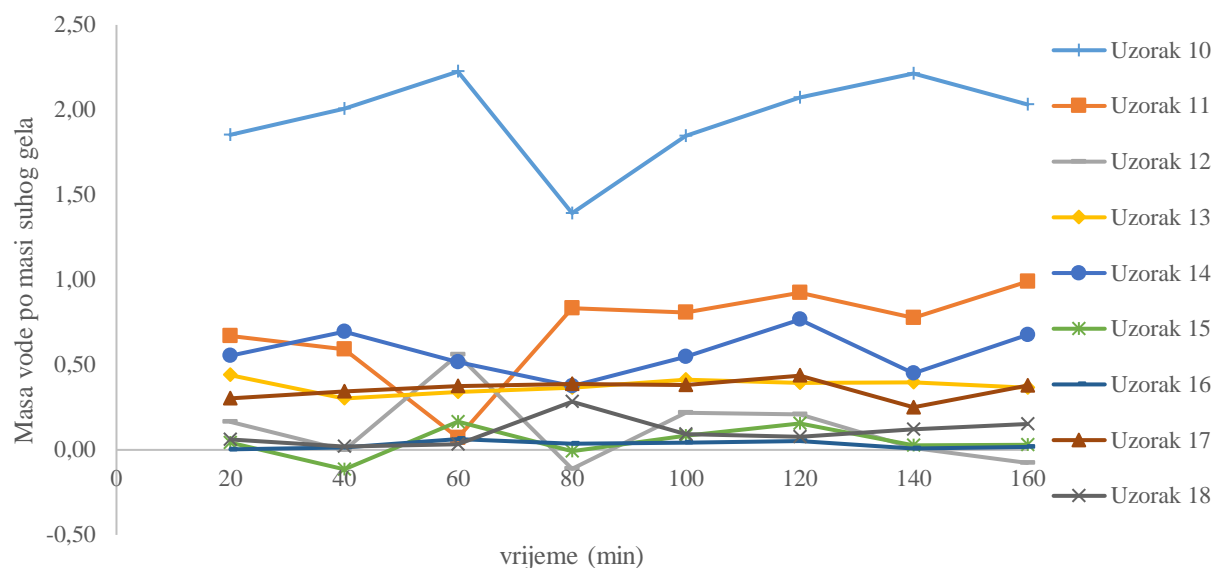
Slika 10. Bubrenje kapsula osušenih na zraku

Slika 10 prikazuje rezultate bubrenja kapsula sušenih na zraku te je vidljivo kako je nakon 20 min došlo do bubrenja svih 9 uzoraka. Uzorci 2 i 4 prikazuju najveću vrijednost mase apsorbirane vode po masi suhog gela nakon početnih 20 min, dok uzorci 6, 8 i 9 prikazuju dvostruko manje vrijednosti. Uzorci 1, 3, 5 i 7 prikazuju najmanje vrijednosti mase apsorbirane vode po masi suhog gela nakon početnih 20 min.

Vidljivo je kako kod uzoraka 2 i 4 nakon 40 min porast mase apsorbirane vode je znatno manji i približio se vrijednostima dobivenim kod uzoraka 3, 4, 6, 7, 8 i 9 dok jedino kod uzorka 1 nakon 40 min dolazi do znatnog povećanja mase apsorbirane vode. Nakon 60 min, kod većine uzoraka dolazi do stagnacije, odnosno postizanja ekvilibrija, osim kod uzoraka 1 i 8 gdje dolazi do povećanja apsorbirane mase vode nakon 100 i 120 min, dok kod uzorka 9 nakon 120 min dolazi do smanjenja apsorbirane vode.

Kod bubrenja u vodenom mediju, bubrenje suhih kapsula se pripisuje vezanju vode na hidrofilne grupe alginata. Bubrenje ovisi o transportu vode i Na^+ iona u kapsulu gela mehanizmima difuzije. Lević i sur. (2015) u provedenom istraživanju navode kako je vrijeme reverzibilnog bubrenja 20 min te to definiraju kao vrijeme potrebno za elastičnu volumetrijsku deformaciju gela uzrokovanu ulaskom vode u kapsule. Nakon toga vremena, bubrenje Ca-alginat gela u vodi je u ekvilibriju, stanju ravnoteže. Njihovi rezultati prikazuju kako je reverzibilno bubrenje bilo izraženije kod manjih kapsula, onih dobivenih elektrostatskom ekstruzijom (primjenom napona), nego kod većih, dobivenih postupkom slobodnog kapanja.

Reverzibilno bubrenje je bilo znatno izraženije kod većih koncentracija Ca-alginata (0,03 u odnosu na 0,02 g/mL), što objašnjavaju višim koncentracijama hidrofilnih alginatnih lanaca koje uzrokuje veću apsorpciju vode. S druge strane, dodavanje arome djeluje kao fizička barijera kod transporta vode.



Slika 11. Bubrenje liofiliziranih kapsula

Slika 11 prikazuje rezultate bubrenja liofiliziranih kapsula u vodenom mediju te je vidljivo da nakon 20 min dolazi do bubrenja i povećanja mase apsorbirane vode u svim uzorcima. Kod uzorka 10 dolazi do najveće apsorpcije mase vode do 60 min. U istom uzorku je masa kapsula veće veličine, ima udio alginata od 1 % i nema proteina sirutke. Također, uzorak 10 prikazuje puno veću masu apsorbirane vode u prvih 60 min u odnosu na sve uzorke koji su sušeni na zraku. Uzorak 14 također ima znatno povećanje mase apsorbirane vode te se također radi o uzorku većih dimenzija i udjela alginata od 1, 5%.

Kod uzoraka 15 i 18 pretpostavka je da je došlo do gubitka strukturnog integriteta prilikom liofilizacije te su zbog toga dobivene negativne vrijednosti. Kod uzoraka 13 i 17 nakon 20 min rehidracije je postignut ekvilibrij te dolazi do stagnacije kod apsorpcije vode, dok kod uzorka 11 to se postiže nakon 80 min.

Degroot i Neufeld (2001) su dokazali u svome istraživanju kako liofilizacija kapsula s alginatom dovodi do njihovog skupljanja i smanjivanja veličine pora te kako uslijed rehidracije one ne poprimaju isti dijametar, što se pripisuje manjim porama liofiliziranih kapsula od mokrih. Međutim, to je suprotno rezultatima koje su objavili Lević i sur. (2015). S druge strane, Chen i sur. (2011) u svome istraživanju prikazuju da dodatak proteina sirutke ne utječe na bubrenje kapsula te nema vidljivih razlika u bubrenju alginatnih kapsula i onih s dodanim proteinima sirutke, što je primijećeno i u ovom istraživanju.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Primjena elektrostatske ekstruzije eteričnog ulja sjemenki komorača pokazala se učinkovitom u proizvodnji kapsula poželjnih karakteristika.
2. Variranjem udjela alginata, proteina sirutke i načina sušenja kapsula određeno je iskorištenje postupka u rasponu od 37,75 do 56,97 %, a udio alginata ima značajan utjecaj na iskorištenje procesa, gdje iskorištenje raste s porastom udjela alginata.
3. Učinkovitost značajno varira ovisno o primijenjenim uvjetima te je određena u rasponu od 6,16 do 51,95 %.
4. Vrijednosti kapaciteta uklapanja eteričnog ulja određene su u rasponu od 37,88 do 82,60 %, a sva tri ispitivana parametra značajno utječu na kapacitet uklapanja.
5. Promjer d_{\max} mokrih kapsula određen je u rasponu od 2,97 do 3,67 mm, dok je promjer d_{\min} bio u rasponu od 2,50 do 3,39 mm, gdje su pri najvišim vrijednostima variranih parametara određene najviše vrijednosti d_{\max} i d_{\min} mokrih kapsula. Promjer suhih kapsula d_{\max} određen je u rasponu od 1,71 do 2,75 mm, dok je promjer d_{\min} bio u rasponu od 1,18 do 2,29 mm. Najviše vrijednosti d_{\max} i d_{\min} suhih kapsula određene su nakon liofilizacije.
6. Faktor sferičnosti mokrih kapsula određen je u rasponu od 0,03 do 0,09, a mokre kapsule su generalno bile sferičnog oblika. Faktor sferičnosti suhih kapsula određen je u rasponu od 0,06 do 0,22 te sušenjem dolazi do gubitka sferičnosti kapsula.
7. Faktor skupljanja određen je u rasponu od 0,17 do 0,55, a sva tri ispitivana parametra imaju statistički značajan utjecaj na faktor skupljanja, gdje se porastom udjela i alginata i proteina sirutke značajno povećava vrijednost faktora skupljanja, kao i pri sušenju na zraku.
8. Rehidracijom kapsula u vodenom mediju dolazi do bubrenja svih uzoraka nakon 20 min, a uzorci sušeni liofilizacijom su pokazali veći stupanj apsorpcije vode u usporedbi s uzorcima sušenim na zraku.
9. Optimalni uvjeti inkapsulacije eteričnog ulja sjemenki komorača postupkom elektrostatske ekstruzije, pri kojima se dobivaju kapsule optimalnih karakteristika su: udio alginata 1,5 %, udio proteina sirutke 1 % i liofilizacija kao način sušenja.

6. LITERATURA

- Anka ZM, Gimba SN, Nanda A, Salisu L (2020) Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Foeniculum Vulgare*. *IOSR J. Pharm.* **10**, 1-10.
- Badgajar SB, Patel VV, Bandivdekar AH (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *BioMed Res Int* **2014**, 1-33. doi:10.1155/2014/842674
- Balbino S, Repajić M, Obranović M, Medved AM, Tonković P, Dragović-Uzelac V (2021) Characterization of lipid fraction of Apiaceae family seed spices: Impact of species and extraction method. *J Appl Res Med and Aromat Plants* **25**, 1-10. doi:10.1016/j.jarmap.2021.100326
- Bamidele OP, Emmambux MN (2021) Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: a review. *Crit Rev Food Sci* **61**, 3100–3118. doi:10.1080/10408398.2020.1793724
- Baptista-Silva S, Borges S, Ramos OL, Pintado M, Sarmiento B (2020) The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. *J Essent Oil Res* **32**, 279–295. doi:10.1080/10412905.2020.1746698
- Belabdelli F, Piras A, Bekhti N, Falconieri D, Belmokhtar Z, Merad Y (2020) Chemical Composition and Antifungal Activity of *Foeniculum vulgare* Mill. *Chemistry Africa* **3**, 323–328. doi:10.10007/s42250-020-00130-x
- Benavides S, Cortés P, Parada J, Franco W (2016) Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chem* **204**, 77–83. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.104
- Bukhari H, Shehzad A, Saeed K, Sadiq Butt M, Tanveer S, Iftikhar T, i sur. (2014) Compositional profiling of fennel seed. *Pak J Food Sci* **24**, 132–136.
- Champagne CP, Fustier P (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotech* **18**, 184–190. doi:10.1016/j.copbio.2007.03.001
- Chan ES, Lee BB, Ravindra P, Poncelet D (2009) Prediction models for shape and size of calcium alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *J Colloid Interf Science* **338**, 63–72. doi:10.1016/j.jcis.2009.05.027

- Chan ES, Wong SL, Lee PP, Lee JS, Ti TB, Zhang Z, i sur. (2011) Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydr Polym* **83**, 225–232. doi:10.1016/j.carbopol.2010.07.044
- Chen X, Guo Z, Xin J, Li J, Li J (2011) Modulated insulin release from glucose-sensitive multilayer films. *J Control Release* **152 Suppl 1**. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.057
- Dajic Stevanovic Z, Sieniawska E, Glowniak K, Obradovic N, Pajic-Lijakovic I (2020) Natural Macromolecules as Carriers for Essential Oils: From Extraction to Biomedical Application. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 563. doi:10.3389/fbioe.2020.00563
- Degroot AR, Neufeld RJ (2001) Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α -chymotrypsin with chitosan membranes. *Enzyme Microb Technol* **29**, 321-327. doi:10.1016/S0141-0229(01)00393-3
- Dias DR, Botrel DA, Fernandes RVDB, Borges SV (2017) Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Curr Opin Food Sci* **13**, 31–37. doi:10.1016/j.cofs.2017.02.001
- Douglas Schneider (2014) Fennel seeds, <[https://douglasschneider.com/culinary-herbs-spices-stock-art-illustrations/#iLightbox\[gallery-1\]/43](https://douglasschneider.com/culinary-herbs-spices-stock-art-illustrations/#iLightbox[gallery-1]/43)>. Pristupljeno 15. svibnja 2022.
- Đorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A, i sur. (2014) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng Rev* **7**, 452–490. doi:10.1007/s12393-014-9106-7
- Đorđević V, Paraskevopoulou A, Mantzouridou F, Lalou S, Pantić M, Bugarski B, i sur. (2016) Encapsulation Technologies for Food Industry. U: Nedović V, Raspor P, Lević J, Tumbas Šaponjac V, Marbosa-Cánovas G (ured.) *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*. Springer Science and Business Media LLC, Berlin/Heidelberg, Njemačka, str. 329–382. doi:10.1007/978-3-319-24040-4_18
- El-Awadi ME, Hassan EA, Cairo E (2010) Physiological Responses of Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill) Plants to Some Growth Substances: The Effect of Certain Amino Acids and a Pyrimidine Derivative. *J Am Sci* **6(7)**, 120-125.
- Gallo TCB, Cattelan MG, Alvim ID, Nicoletti VR (2020) Oregano essential oil encapsulated in alginate beads: Release kinetics as affected by electrostatic interaction with whey proteins and freeze-drying. *J Food Process Preserv* **44**, 1-11. doi:10.1111/jfpp.14947

- Hong SJ, Yoon S, Jo SM, Jeong H, Youn MY, Kim YJ, i sur. (2022) Olfactory Stimulation by Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Essential Oil Improves Lipid Metabolism and Metabolic Disorders in High Fat-Induced Obese Rats. *Nutrients* **14**, 741. doi:10.3390/nu14040741
- Javed R, Hanif MA, Ayub MA, Rehman R (2019) Fennel. U: Hanif MA, Nawaz H, Khan MM, Byrne HJ (ured.) *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery*. Elsevier, Amsterdam, str. 241–256.
- Jurić S. (2020) Bioencapsulation as a sustainable delivery of active agents for plant nutrition/protection and production of functional foods (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Kalleli F, Bettaieb Rebey I, Wannas WA, Boughalleb F, Hammami M, Saidani Tounsi M, i sur. (2019) Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *J Food Biochem* **43(8)**, 1-14. doi:10.1111/jfbc.12935
- Kalođera Z, Blažević N, Salopek N, Jurišić R (1998) Eterična ulja (aetherolea) *Farm Glas* **54(6)**, 195-210.
- Kokina M, Salevic A, Kalušević A, Levic S, Pantic M, Dejan Pljevljakušić, i sur. (2019) Characterization, antioxidant and antibacterial activity of essential oils and their encapsulation into biodegradable material followed by freeze drying. *Food Technol Biotech* **57**, 282–289. doi:10.17113/ftb.57.02.19.5957
- Kooti W, Moradi M, Ali Akbari S, Sharafi-Ahvazi N, Asadi-Samani M, Ashtary-Larky D (2015) Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *J HerbMed Pharmacol* **4(1)**, 1-9.
- Kostić IT, Isailović BD, Dordević VB, Lević SM, Nedović VA, Bugarski BM (2012) Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci. *Hemijska Industrija* **66**, 505–517.
- Lević S, Pajić Lijaković I, Dorević V, Rac V, Rakić V, Šolević Knudsen T, i sur. (2015) Characterization of sodium alginate/d-limonene emulsions and respective calcium alginate/d-limonene beads produced by electrostatic extrusion. *Food Hydrocolloids* **45**, 111–123. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.10.001
- Matthäus B, Özcan MM (2015) Oil content, fatty acid composition and distributions of vitamin-E-active compounds of some fruit seed oils. *Antioxidants* **4**, 124–133. doi:10.3390/antiox4010124

- Mehta N, Kumar P, Verma AK, Umaraw P, Kumar Y, Malav OP, i sur. (2022) Microencapsulation as a Noble Technique for the Application of Bioactive Compounds in the Food Industry: A Comprehensive Review. *Appl Sci* **12(3)**, 1424. doi:10.3390/app12031424
- Napoli EM, Curcuruto G, Ruberto G (2010) Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochem Syst Ecol* **38(2)**, 213–223. doi:10.1016/j.bse.2010.01.009
- Onsaard, E., Onsaard, W. (2019) Microencapsulated Vegetable Oil Powder. U: Salaün F (ured.) Microencapsulation - Processes, Technologies and Industrial Applications, IntechOpen doi:10.5772/intechopen.85351
- Prüsse U, Bilancetti L, Bučko M, Bugarski B, Bukowski J, Gemeiner P, i sur. (2008) Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem Pap* **62**, 364–374. doi:10.2478/s11696-008-0035-x
- Ramdhan T, Ching SH, Prakash S, Bhandari B (2020) Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. *Trends Food Sci Tech* **106**, 150–159. doi:10.1016/j.tifs.2020.10.002
- Reis DR, Ambrosi A, Di Luccio M (2022) Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. *Future Foods* **5 (2022)**, 100126. doi:10.1016/j.fufo.2022.100126
- Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, Khalel KI (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crop Prod* **44**, 437–445. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.012
- Rodríguez J, Martín MJ, Ruiz MA, Clares B (2016) Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Res Int* **83**, 41–59. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.032
- Saber JI, Eshra DH (2019) Using fennel and its oil as a preservative and functional food to produce food and Drink products to be used to alleviate cough symptoms. *Alexandria Sci Exchange J* **40**, 406–414. doi:10.21608/asejaiqjsae.2019.44629
- Sangsuwan J, Sutthasupa S (2019) Effect of chitosan and alginate beads incorporated with lavender, clove essential oils, and vanillin against *Botrytis cinerea* and their application in fresh table grapes packaging system. *Packag Technol Sci* **32**, 595–605. doi:10.1002/pts.2476

- Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF, Omer EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, i sur. (2011) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* **16**, 1366–1377. doi:10.3390/molecules16021366
- Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W (2018) Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci Tech* **78**, 34–60. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.018
- Soliman EA, El-Moghazy AY, El-Din MSM, Massoud MA (2013) Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. *J Encapsulation Adsorpt Sci* **03**, 48–55. doi:10.4236/jeas.2013.31006
- Timilsena YP, Haque MdA, Adhikari B (2020) Encapsulation in the Food Industry: A Brief Historical Overview to Recent Developments. *Food Nutr Sci* **11**, 481–508. doi:10.4236/fns.2020.116035
- USDA (2019) Spices, fennel seed. USDA - U.S. Department of Agriculture, <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171323/nutrients>. Pristupljeno 17. svibnja 2022
- Vinceković, M., Jurić, S., Vlahoviček-Kahlina, K., Vugrinec, B. i Lemić, D. (2020). Primjena inkapsuliranih eteričnih ulja u suzbijanju štetnih organizama. *Glasilo biljne zaštite*, **20** (6), 584-606.
- Volić M, Pajić-Lijaković I, Djordjević V, Knežević-Jugović Z, Pećinar I, Stevanović-Dajić Z, i sur. (2018) Alginate/soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. *Carbohydr Polym* **200**, 15–24. doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.033
- Yilmaztekin M, Lević S, Kalušević A, Cam M, Bugarski B, Rakić V, i sur. (2019) Characterisation of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil encapsulates. *J Microencapsul* **36**, 109–119. doi:10.1080/02652048.2019.1607596

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Katarina Robić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Katarina Robić

Vlastoručni potpis