

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Filip Erjavec

6808/PT

INKAPSULACIJA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA
RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.) U
ALGINATNE NOSAČE S DODATKOM KAKAOVOG
PRAHA I ROGAČA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: Prof. dr. sc. *Draženka Komes*

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

INKAPSULACIJA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.) U ALGINATNE NOSAČE S DODATKOM KAKAOVOG PRAHA I ROGAČA

Filip Erjavec, 0058204227

Sažetak: Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), kulinarska i ljekovita biljna vrsta, zahvaljujući svom bogatom bioaktivnom sastavu, posebice polifenolima, često se koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje različitih simptoma bolesti, a u posljednje vrijeme čest je sastojak različitih funkcionalnih proizvoda. No, polifenolni spojevi imaju nisku bioraspoloživost nakon oralne konzumacije i lako podliježu promjenama tijekom različitih uvjeta proizvodnje, zbog čega se u svrhu zaštite polifenola sve češće koristi metoda inkapsulacije. Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost inkapsulacije polifenolnog ekstrakta ružmarina u različite sustave nosača na bazi alginata (A) primjenom ionskog geliranja, gdje je posebno ispitan potencijal kakaovog praha (KP) i rogača (R), kao novih materijala za inkapsulaciju. Ispitan je i utjecaj koncentracije alginata (4% i 5%) na inkapsulacijsku učinkovitost polifenola ružmarina. Dobivenim hidrogel česticama određen je udjel vode, fizikalne i morfološke karakteristike, učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, kao i profili otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Dobiveni rezultati pokazali su da je veća koncentracija alginata (5%) rezultirala nastajanjem većih, tvrdih i elastičnijih čestica, a dodatak KP i R u alginatni nosač rezultirao je tvorbom manjih, mekših i manje elastičnih čestica. Dodatkom KP i R u alginatni gel povećala se inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, te učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta te se usporilo otpuštanje polifenola iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Najveću inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola (95,08%) i hidroksicimetnih kiselina (95,37%) imao je sustav 4% A-R, kao i najveće zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta (91,83% -ABTS i 93,60% -DPPH). Kakaov prah i rogač, kao nove, do sada neispitane, sirovine u sustavu nosača za inkapsulaciju, pokazale su jako veliki potencijal za inkapsulaciju polifenola.

Ključne riječi: alginat, inkapsulacija, kakaov prah, polifenoli, rogač, ružmarin

Rad sadrži: 46 stranica, 13 slika, 5 tablice, 85 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Arijana Bušić, mag.ing.

Datum obrane: srpanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for technology of carbohydrates and confectionery products
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ENCAPSULATION OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) POLYPHENOLIC EXTRACT IN ALGINATE-BASED DELIVERY SYSTEMS WITH ADDITION OF COCOA POWDER AND CAROB

Filip Erjavec, 0058204227

Abstract: Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), culinary and medicinal herb, due to its rich bioactive composition, especially polyphenols, is often used in traditional medicine for treatment of various disease symptoms, and recently has become a common ingredient of various functional products. Recently, encapsulation technique has been established as an effective technique for polyphenols entrapment and protection, since polyphenols have low bioavailability after oral consumption, and they are very unstable during different production conditions. The aim of this study was to investigate encapsulation efficiency of rosemary polyphenolic extract in various alginate-based (A) delivery systems using ionic gelation, with the emphasis on evaluation of the potential of cocoa powder (CP) and carob (C), as new encapsulation materials. The influence of alginate concentration (4% and 5%) on encapsulation efficiency of rosemary polyphenols was also examined. Obtained hydrogel beads were investigated for water content, physical and morphological properties, encapsulation efficiency of polyphenols and retained antioxidant capacity, as well as release profiles of polyphenols and antioxidant capacity from hydrogel in simulated gastrointestinal conditions. Obtained results showed that the addition of CP and C to alginate carrier resulted in decreased particle size of beads, more soft and less elastic beads, while higher alginate concentration (5%) resulted in formation of bigger, harder and more elastic particles. The addition of CP and C increased the encapsulation efficiency of total polyphenols and hydroxycinnamic acids and retained antioxidant capacity, and showed slower release of polyphenols from beads in simulated gastrointestinal conditions. The highest encapsulation efficiency of total polyphenols (95.08%) and hydroxycinnamic acids (95.37%) revealed delivery system 4% A-C, as well as the highest retention of antioxidant capacity (91.83% - ABTS and 93.60% - DPPH). Cocoa powder and carob, as new, uninvestigated materials in encapsulation delivery systems, have shown a great potential for encapsulation of polyphenols.

Keywords: alginate, encapsulation, polyphenols, rosemary, carob, cocoa powder

Thesis contains: 46 pages, 13 figures, 5 tables, 85 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: Arijana Bušić, MSc

Defence date: July, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva.....	2
2.2. Inkapsulacija.....	3
2.2.1. Metode inkapsulacije	5
2.2.1.1. Fizikalne metode inkapsulacije.....	5
2.2.1.2. Kemijske metode inkapsulacije	6
2.2.1.3. Fizikalno – kemijske metode inkapsulacije	6
2.3. Ružmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	8
2.3.1. Kemijski i bioaktivni sastav ružmarina.....	9
2.3.2. Inkapsulacija aktivnih spojeva ružmarina	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijal	11
3.1.1. Uzorci.....	11
3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta ružmarina	11
3.1.2. Kemikalije.....	11
3.1.3. Aparatura i pribor	12
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	14
3.2.2. Određivanje udjela hidrosicimernih kiselina	15
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	16
3.2.3.1. ABTS metoda	16
3.2.3.2. DPPH metoda.....	17
3.2.4. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina u sustave nosača na bazi	18
alginata ionskim geliranjem	18
3.2.5. Karakterizacija čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina	19
3.2.5.1. Određivanje udjela vode	19
3.2.5.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika.....	20
3.2.5.3. Određivanje parametara boje	20
3.2.5.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja	21
antioksidacijskog kapaciteta	21
3.2.5.5. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u ...	22
simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	22
3.2.5.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta ružmarina	25

4.2. Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.....	26
4.3. Fizikalne i morfološke karakteristike hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina	26
4.4. Određivanje parametara boje u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom	29
4.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanje antioksidacijskog .. kapaciteta u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.....	30
4.6. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica s	33
inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.....	
4.7. Povećanje mase liofiliziranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina nakon... vezanja vode	37
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Polifenoli su bioaktivni spojevi koji se nalaze u hrani, a zahvaljujući jakim antioksidacijskim svojstvima imaju mnoge pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, zbog čega postoji veliki interes za njihovom primjenom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Djelovanje polifenola na ljudsko zdravlje, prevencija određenih bolesti i simptoma ovisi o njihovoj bioraspoloživosti, odnosno koliko je polifenola probavljeno i metabolizirano (Pandey i Rizvi, 2009). Također, polifenole karakterizira nestabilnost prema vanjskim okolišnim uvjetima (temperatura, vlaga), termičkim obradama namirnica, a podložni su i metaboličkim promjenama u probavnom sustavu. Moguće rješenje za zaštitu polifenola i povećanje njihove bioraspoloživosti je primjena tehnike inkapsulacije. Inkapsulacija je proces u kojem su krute čestice, tekućina ili plin zadržane unutar inertnog materijala (nosača), koji izolira i štiti komponente koje su inkapsulirane od vanjskih uvjeta (Zhu i sur., 2012; Kuang i sur., 2010; Ghosh, 2006; Desai i Park, 2005). Najveći izazov ove tehnike je odabrati odgovarajuću metodu inkapsulacije te sustav nosača koji će rezultirati visokom učinkovitošću inkapsulacije tvari koja se imobilizira (Desai i Park, 2005). Kod inkapsulacije u prehrambenoj industriji koriste se različiti biopolimeri, a najčešće ugljikohidrati poput alginata (Tan HL i sur., 2009), pektina (Gharsallaoui A, 2007), gumearabiea (Meer, 1980), guar gume, maltodekstrina (Gharsallaoui A, 2007), itd. No, zbog poroznosti polisaharidnih gelova, isti se u svrhu smanjenja poroznosti te učinkovitijeg zadržavanja aktivnih tvari često kombiniraju s drugim materijalima.

Cilj ovog rada je primjenom ionskog geliranja i različitih sustava nosača na bazi alginata inkapsulirati polifenolni ekstrakt ružmarina. Pri tome, naglasak će se staviti na ispitivanje potencijala novih materijala u sustavima alginatnog gela, poput kakaovog praha i rogača, koji do sada u inkapsulacijske svrhe nisu korišteni. Prvo će se provesti bioaktivna karakterizacija vodenog ekstrakta ružmarina primjenom spektrofotometrijskih metoda. Nakon inkapsulacije ekstrakta ružmarina u alginatne nosače, dobivenim hidrogel česticama odredit će se udjel vode, fizikalne (veličina, parametri teksture) i morfološke (izgled čestica) karakteristike te parametri boje. Nadalje, ispitat će se učinkovitost inkapsulacije polifenola, kao i učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u novo formuliranim sustavima alginatnih nosača s kakaovim prahom i rogačem. Također, profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica ispitat će se u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva

Polifenoli su sekundarni metaboli koji čine najrašireniju skupinu prirodnih spojeva u biljnom svijetu, s preko 8000 poznatih struktura. U svojoj kemijskoj strukturi imaju jedan ili više aromatskih prstena na koji su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (Tsao, 2010). Osnovna podjela polifenola je na fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimene), flavonoide (flavoni, flavanoli, flavanoni, flavonoli, izoflavoni), stilbene i lignane (Hardman, 2014). Dokazano je da polifenoli snižavaju krvni tlak (Rouse i sur., 1983), smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti (Hertog i sur., 1993), imaju važnu ulogu kod aterogeneze (Stocker i Keaney, 2004), sprječavaju promjene na stanicama izazvane oksidacijom, a time i razvoj degenerativnih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom (Luqman i Rizvi, 2006). Također, mogu izazvati smanjenje stanica tumora i spriječiti njihov rast (Yang i sur., 2001) te popravljaju lipidni profil (snižavaju koncentraciju LDL kolesterola i triglicerida) (Choi i sur., 2010). Upravo zbog navedenog, u posljednje vrijeme sve je veći interes prehrane, ali i ostalih industrija, za korištenjem polifenola, kao tvari koje pozitivno utječu na ljudsko zdravlje, pa je tako i sve veći interes znanstvenika za ispitivanjem potencijalnih primjena polifenola u različite svrhe.

Učinkovitost polifenolnih spojeva i njihov utjecaj na ljudsko zdravlje uvelike ovisi o njihovoj bioraspoloživosti, odnosno koliko je tih tvari probavljeno, apsorbirano i metabolizirano. Istraživanja pokazuju da najčešće udjel polifenola koji je unesen hranom ne odgovara njihovoj bioraspoloživosti u ljudskom organizmu (Pandey i Rizvi, 2009). Polifenoli prolaze nekoliko procesa u ljudskom probavnom sustavu: 1) otpuštanje polifenola iz matriksa hrane; 2) promjena polifenola u gastrointestinalnim uvjetima; 3) stanični unos aglikona i konjugiranih polifenola enterocitima; 4) mikrobiološka fermentacija neapsorbiranih polifenola te ponovno izlučenih iz žuči i pankreasa; 5) enzimska modifikacija; 6) transport u krvotok i ostala tkiva; 7) izlučivanje preko bubrega ili ponovno izlučivanje u crijeva preko soka žuči i pankreasa. Najveći dio polifenola apsorbira se u gastričnim uvjetima zbog razgradnje pepsinom, zajedno sa peristaltičkim kretanjima i niskim pH. Na bioraspoloživost polifenola u namirnicama i proizvodima utječu različiti vanjski čimbenici, kao što su uvjeti uzgoja voća i povrća (klimatski uvjeti, zemlja itd.), zrelost i skladištenje biljaka, različiti tehnološki procesi tijekom tretiranja hrane, poput sušenja i mljevenje, pri čemu se gubi značajan dio polifenolnih spojeva (Shofian u sur., 2011; Abid i sur., 2013). Također, toplinskom obradom se također povećava rizik od degradacije i oksidacije polifenola, ali moguće je i povećanje

bioraspoloživosti zbog omekšanja staničnih stijenki. Na bioraspoloživost polifenolnih spojeva utjecaj ima i da li je hrana u tekućem ili krutom stanju. Većina tekuće hrane je male viskoznosti i brže prolazi kroz želudac te sadrži više vode i najčešće manje proteina i lipida koji bi vezali polifenole, dok hrana u krutom stanju može otežati apsorpciju, ali također može i stabilizirati i zaštititi određene komponente do same apsorpcije. Lipidi, proteini i probavljivii ugljikohidrati također utječu na bioraspoloživost ovisno o udjelu i vezama koje stvaraju sa polifenolnim spojevima (Bohn, 2004). Inkapsulacija se pokazala kao tehnika koja pozitivno utječe na apsorpciju polifenola, budući da matriks u kojem je inkapsuliran određeni aktivni spoj minimalizira kontakt s ostalim spojevima te omogućava transport do crijeva. Ova tehnika je pogodna i za slabo topljive polifenole (de Vos i sur., 2010).

2.2. Inkapsulacija

U posljednje vrijeme fokus znanstvenika i prehrambene industrije je na obogaćivanju proizvoda funkcionalnim spojevima ili nutraceuticima. Problem je u tome što su te komponente poput polifenola podložne oksidaciji te su vrlo osjetljive na gastrointestinalne uvjete (Fang i Bandhari, 2010). Jedan od mogućih načina očuvanja aktivnih komponenata i postizanja željenog zdravstvenog učinka jest njihova zaštita od okolišnih uvjeta i neželjenih promjena. Inkapsulacija je proces u kojem su krute čestice, tekućina ili plin zadržane unutar inertnog materijala (nosača), koji izolira i štiti inkapsulirane komponente od vanjskih uvjeta (Zhu i sur., 2012; Kuang i sur., 2010; Ghosh, 2006; Desai i Park, 2005). Inkapsulirati se mogu bioaktivne komponente poput antioksidansa, vitamina, fitosterola, mineralnih tvari, masnih kiselina i živih stanica, kao što su probiotici (Fang i Bandhari, 2010; Anal i Singh, 2007). Omotač oko inkapsulirane tvari omogućava separaciju jezgre od okoliša sve dok tvar ne bude otpuštena u okolinu u određenim uvjetima i kontroliranom brzinom (Desai i Park, 2005). Također, cilj inkapsulacije je čuvanje lako hlapljivih komponenata (aroma), zaštita sastojaka tijekom skladištenja i transporta, zaštita tijekom tehnoloških procesa gdje se hrana izlaže visokim temperaturama, kisiku i svjetlosti, prevencija od reakcija s drugim komponentama u hrani (kisik, voda). Inkapsulacijom se prekriva često gorak okus polifenola zbog čega se inače ne dodaju u visokim koncentracijama (Nedović i sur., 2011). Danas inkapsulacija ima široku primjenu u prehrambenoj industriji, pa se često koristi za obogaćivanje hrane s bioaktivnim komponentama poput vitamina, mineralnih tvari, antioksidansa i probiotika (Wandrey i sur., 2009) te prirodnih aroma (Lalou i sur., 2013). Inkapsulacijom se odvajaju komponente u hrani koje inače međusobno reagiraju, tako se

kod inkapsulacije eteričnih ulja spriječava njihova reakcija s vodom ili kisikom te se postižu željena fizikalna svojstva (Desai i sur., 2005). Inkapsulacija ima veliku primjenu i u poljoprivednoj industriji za proizvodnju herbicida (Wang i Zhao, 2013) te u farmaceutskoj industriji kod inkapsulacije različitih lijekova i aktivnih supstanci s terapijskim efektom (Donbrow, 1991).

Morfologija čestica dobivenih inkapsulacijom ovisi o materijalu jezgre (inkapsulirane tvari) i omotača te se razlikuju (Slika 1):

- 1) mononuklearne čestice – sadrže omotač oko jezgre
- 2) polinuklearne čestice – sadrže mnogo jezgri oko omotača
- 3) matične čestice – tvar jezgre je homogeno raspoređena u materijalu (Jyothi Sri i sur., 2012.)



Slika 1. Podjela čestica s obzirom na morfološka svojstva (Prilagođeno iz Jyothi i sur., 2010)

S obzirom na veličinu inkapsulirane čestice dijele se na nanočestice (veličine od 10 do 1000 nm), mikročestice (veličine od 2 do 2000 μm) i makročestice (veličine veće od 2000 μm) (Singh i sur., 2010).

Materijali koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju mogu se podijeliti na ugljikohidrate, lipide, proteine, sintetičke i neorganske materijale. Najčešće primjenjivani materijali za inkapsulaciju su ugljikohidrati: glukoza, saharoza, fruktoza, maltodekstrin, škrob i celuloza. Posebno važnu ulogu imaju polisaharidi poput guma ili hidrokoloida (Kosaraju i sur., 2005). Od proteina, kao materijali za inkapsulaciju, najčešće se koriste gluten, kazein, proteini surutke i želatina (Wandrey i sur., 2010). Lipidni materijali, kao što su masti, ulja, fosfolipidi i voskovi, koriste se u metodama inkapsulacije gdje dolaze do izražaja njihova hidrofobna svojstva, poput emulzija ili liposoma (Wandrey i sur., 2010). S tehnološkog

aspekta jedan od značajnijih voskova je karuba vosak. Od sintetičkih materijala koristi se polivinil pirolidon (PVP) koji se odlikuje dobrim svojstvima formiranja filma i termičkim svojstvima (Wandrey i sur., 2010).

2.2.1. Metode inkapsulacije

Danas postoje brojne metode inkapsulacije i neke od njih se duže koriste i u industrijskoj mjerilu. Odabir metode ovisi o fizikalnim svojstvima i tipu jezgre i nosača, a od odabrane metode očekuje se visoka učinkovitost inkapsulacije i da čestice budu određene željene veličine i poželjnih morfoloških svojstava te što pravilnijeg oblika (bez repova ili udubina) (Đorđević i sur, 2014; Vladisavljević, 2012).

Metode inkapsulacije podijeljene su u četiri skupine s obzirom na njihovu izvedbu:

1. Fizikalne metode: primjena superkritičnih fluida, sušenje raspršivanjem
2. Kemijske metode: „in situ“ polimerizacija, granična polikondenzacija i granično unakrsno povezivanje
3. Fizikalno – kemijske metode: emulzifikacija i isparavanje otapala, inkapsulacija hlađenjem emulzija, metode temeljene na ionskim interakcijama (ionsko geliranje, koacervacija, *Layer-by-layer* metoda), metode temeljene na hidrofobnim interakcijama
4. Ostale metode: inkapsulacija u stanicama kvasca, ko-kristalizacija i molekularna inkluzija (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

2.2.1.1. Fizikalne metode inkapsulacije

Sušenje raspršivanjem je tehnika dobivanja inkapsuliranih proizvoda koja se temelji na raspršivanju, odnosno atomizaciji prethodno pripremljene smjese bioaktivne komponente i nosača. Proces se odvija u komori koja se zagrijava, uslijed čega dolazi do otparavanja otapala, a čestice se formiraju prolaskom smjese kroz mlaznicu ili rotirajući atomizer. Kao otapalo najčešće se koristi voda, ali se mogu koristiti i organska otapala poput acetona i etanola (Zuidam i Shimoni, 2010).

Metoda inkapsulacije koja primjenjuje superkritične fluide temelji se na prolasku fluida, koji sadrži aktivni sastojak i materijal za inkapsulaciju, iz dijela komore gdje se održavao visoki tlak kroz mlaznicu na atmosferski tlak, uslijed čega dolazi do desolvatacije

materijala za inkapsulaciju pri čemu se on taloži oko bioaktivne komponente te nastaju mikročestice. Najčešće korišteni superkritični plinovi su ugljikov dioksid, alkani s dva, tri ili četiri ugljikova atoma i dušikov oksid (Matsuyama i sur., 2013).

2.2.1.2. Kemijske metode inkapsulacije

Metoda „In situ“ polimerizacije koristi se za formiranje nanočestica, pri čemu se monomerne komponente emulgiraju u vodenoj fazi uz dodatak emulgirajućeg sredstva. Pri tome nastaju niskomolekularni polimeri koji s polimerizacijom rastu (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

„Interfacial“ polimerizacija je kemijska metoda inkapsulacije gdje se membrana od polimera formira oko kapljica emulzije, a reakcija se odvija na granici kontinuirane i disperzne faze (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Proces uključuje otapanje monomera u tekućem mediju kojeg mikroinkapsuliramo te dispergiranje u tekućoj fazi koja sadrži disperznu tvar i dodatakamina, što rezultira brzom polimerizacijom (Scher, 1983).

2.2.1.3. Fizikalno – kemijske metode inkapsulacije

Metoda emulzifikacije temelji se na pripremi emulzija, odnosno dvofaznog sustava koji se sastoji od vodene i uljne faze. Najčešće se pripremaju u homogenizatoru, a kod ove metode bitno je što dulje zadržati stabilnost emulzije. Princip ove metode je da se otopljeni lipidni materijal (masti ili vosak) dispergiraju u vodi, zatim se hlade te nastaju čvrste čestice sa inkapsuliranom aktivnom komponentom. Nedostatak ove metode je taj što može doći do nepotpune inkapsulacije ako je aktivna komponenta topljiva u vodi (Zuidam i Shimoni, 2010).

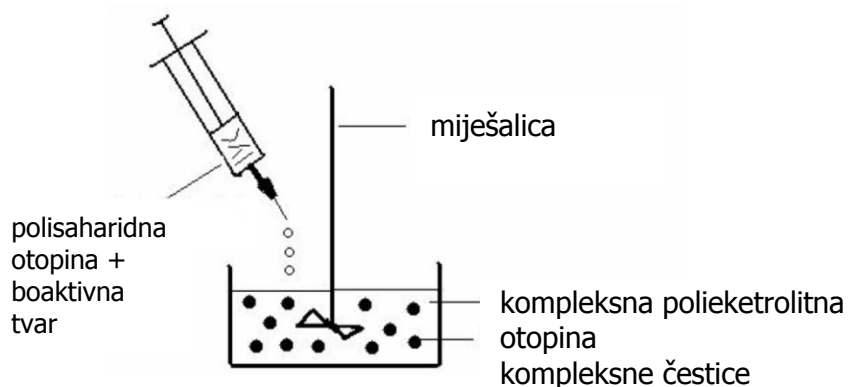
Metoda isparavanja otapala je tehnika gdje aktivna tvar koja se inkapsulira otapa se ili dispergira u polimernom materijalu omotača te se smjesa zagrijava pri čemu dolazi do uparavanja polimernog materijala i vezanja na čestice aktivne tvari (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

Koacervacija je fizikalno – kemijska metoda inkapsulacije koja se bazira na stvaranju koacervata. Za stvaranje koacervata potrebno je stvoriti sistem kod koga je aktivna komponenta dispergirana u npr. polimernom otapalu ili nosaču, koji se zatim prevodi putem variranja parametara, poput pH i temperature sustava, u formu tekućeg filma koji obavlja aktivnu komponentu. Dobivene čestice se onda mogu očvrstiti geliranjem ili sušiti do praškaste forme (Thies, 2005).

Metoda koja se temelji na hidrofobnim interakcijama poput inkapsulacije u liposomima, bazira se na miješanju fosfolipida u vodi, uslijed čega nastaju hidrofilno – hidrofobne interakcije između fosfolipida i vode. Aktivna komponenta u nalazi se u vodenoj

fazi ili je pak vezana za membranu liposoma. Za ovaj postupak koriste se koloidni mlinovi ili postupak mikrofluidizacije, a kao materijali koriste selecitin i kolesterol. Mana inkapsulacije u liposomima je nestabilnost liposoma tijekom vremena i stvaranje krupnijih agregata (Zuidam i Shimoni, 2010).

Ionsko geliranje je fizikalno-kemijska metoda inkapsulacije u kojoj se polisaharidi otapaju u vodi ili slabo kiselom mediju, te se dobivena otopina ukapava u otopinu suprotnog naboja (najčešće otopinu kationa) uz konstantno miješanje. Zbog nastajanja kompleksa između suprotno nabijenih iona, polisaharidi formiraju gel strukturu i talože se u obliku sferičnih čestica. Takve čestice se uklanjaju filtracijom, ispiranu s destiliranom vodom i suše po potrebi (Racovića i sur., 2009).

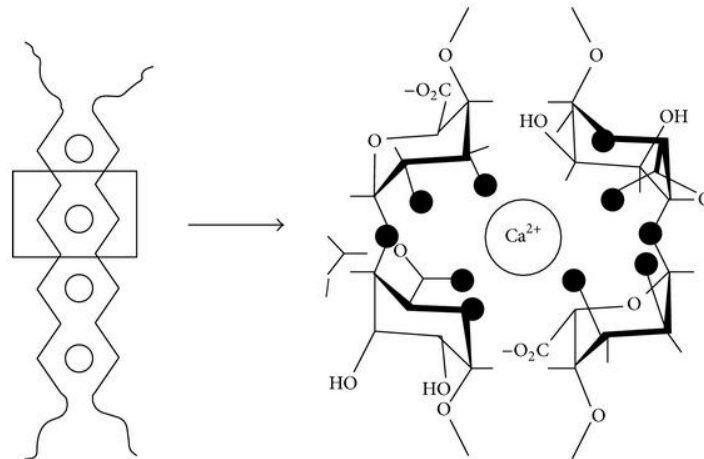


Slika 2. Prikaz pripreme hidrogel čestica metodom ionskog geliranja (Racovića i sur., 2009)

Čimbenici koji utječu na učinkovitost ove metode inkapsulacije, te na veličinu i oblik nastalih čestica, jesu koncentracija polimera i kationa za geliranje, koncentracija bioaktivnog sastojka, temperatura i pH otopine za geliranje (Racovića i sur., 2009).

Jedan od često korištenih prirodnih polimera kod metode ionskog geliranja je alginat. Alginat je polisaharid ekstrahiran iz smeđih algi (Reis i sur., 2006), koji je našao vrlo čestu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog pristupačnosti i niske cijene, te brojnih poželjnih svojstva poput biorazgradivosti, biokompatibilnosti, mukoadhezivnosti. Alginat se ne nakuplja se u organima u tijelu i vrlo dobro je sredstvo za zgušnjavanje i emulgiranje, stvaranje suspenzije, tvorbu filma i tvorbu gela (Kuo i Ma, 2001; Racovića i sur., 2009). Alginat u svojoj strukturi sadrži dvije uronske kiseline, α -L-guluronsku kiselinu i β -D-manuronsku kiselinu, povezane α -1,4- glikozidnom vezom (Racovića i sur., 2009). Do formiranja alginatnih hidrogelova dolazi kada guluronske jedinice iz molekule alginata reagiraju sa metalnim ionima, nakon čega se guluronske jedinice slažu u specifičnu strukturu tzv. model „kutija za jaje“ (eng. „egg box“) (Slika 3). Vezanjem dvovalentinih kationa na

guluronske jedinice nastaje kooperativna jedinica od 20 monomera, i takvim povezivanjem jedinice su stabilne prema disocijaciji (Racovića i sur., 2009). Za formiranje hidrogelova od kationa najčešće sekoriste Ca^{2+} , Ba^{2+} i Al^{3+} , dok Mg^{2+} i jednovalentni kationi ne induciraju geliranje (Kim i Lee, 1992; Racovića i sur., 2009).



Slika 3. Prikaz modela „kutija za jaje“, ionska interakcija između dvovalentnog kationa, Ca^{2+} i karboksilne grupe guluronske kiseline iz molekule alginata (Li i sur., 2007).

2.3. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ružmarin, *Rosmarinus officinalis* L., pripada porodici *Lamiaceae* i višegodišnja je zimzelena aromatična biljka koja ima male igličaste listove (2-3 cm), intenzivnog mirisa, te gorkog i aromatičnog okusa te se najčešće koristi u sušenim obliku ili obliku eteričnog ulja. Potječe s Mediterana, gdje raste na tlu bogatom kalcijem, a pogoduje mu suha klima i slani morski zrak (Oluwatuyi i sur., 2004).

U tradicionalnoj primjeni u ljekovite svrhe upotrebljavaju se listovi, cvjetovi i izdanci u cvatu. Najčešća primjena ružmarina je kao aromatično sredstvo, karmativ i stimulans. Koristi se za probavne poteškoće, bolju cirkulaciju, kao sredstvo za masažu, za čišćenje krvi i kao začini u kulinarstvu. Često se koristi u kozmetičke svrhe, u proizvodnji parfema i sapuna, gdje se koristi mast ili ružmarinovo ulje dobiveno destilacijom grančica i listova (Willfort, 1978). Također, ružmarin je našao široku primjenu u prehrambenoj industriji, gdje se koristi svjež ili osušen. Najčešće se dodaje u različite juhe, pečene proizvode i salate zbog poboljšanja okusa i organoleptičkih svojstva (Viuda-Martos i sur., 2010).

2.3.1. Kemijski i bioaktivni sastav ružmarina

Ružmarin je prihvaćen kao biljka s vrlo visokom antioksidacijskom aktivnošću. Za tu visoku antioksidacijsku sposobnost odgovorni su brojni aktivni spojevi koji se mogu svrstati u tri skupine. Prva skupina su fenolne kiseline: vanilinska, kafeinska, ferulinska i ružmarinska kiselina; drugu skupinu čine diterpeni: karnosol, rosmadial, rosmanol, karnoska kiselina, metil karnosat, epirosmanol, a treća skupina su flavonoidi poput hesperitina, apigenina, genkvanina, cirsimaritina i skutelareina (Cuvelier i sur., 1996).

Biljka ružmarina vrlo je bogata karnozičnom kiselinom, koja djeluje protiv degradacije rožnice, oštećenja mrežnice i makularne degradacije (Rezaie i sur., 2012). U istraživanju koje je proveo Tena sa suradnicima (1997) dokazano je da količina karnozičnom kiseline veća u mladim listovima nego u zrelim i to za 21%. Također, koncentracija ovog spoja postupno se povećava tijekom proljeća sve do ljetnih mjeseci kada je koncentracija najveća, dok nakon listopada se počinje smanjivati. To se povezuje s vremenskim uvjetima kojima je biljka izložena, a naročito ovisi o temperaturi i o količini sunčeve svjetlosti tijekom dana. Karnozična kiselina iz ružmarina može spriječiti i oksidaciju uzrokovanu mikotoksinima, tako da postoji potencijalna mogućnost primjene protiv toksičnog djelovanja aflatoksina B1 (Costa i sur., 2007).

U istraživanju kojeg su proveli Wang i suradnici (2008) analizom je dobiven sastav ulja ružmarina koji pokazuje udjel od 27,23% 1,8-cineola (eukaliptol), 19,43% α -pinena, 14,26% kamfora, 11,52% kamfena i 6,71% β -pinena.

2.3.2 Inkapsulacija aktivnih spojeva ružmarina

Iako je bioaktivni sastav ružmarina relativno dobro poznat za istraživanja vezana za inkapsulaciju aktivnih spojeva ružmarina još uvijek ima dovoljno prostora i mogućnosti. Prema pretraženoj literaturi, najčešće su inkapsulirani aromatični spojevi ružmarina, dok podataka o inkapsulaciji polifenolnih spojeva ružmarina ima jako malo. U tablici 1 prikazana suneka od dosadašnjih istraživanja inkapsulacije ulja ili ekstrakta ružmarina.

Tablica 1. Prikaz istraživanja inkapsulacije aktivnih spojeva ružmarina primjenom različitih sustava nosača i metoda

Spoj	Nosač	Metoda	Referenca
Eterično ulje	polikaprolakton	nanopercipitacija	Ephrem i sur., 2014
Eterično ulje	izolati proteina sirutke i maltodektrin	sušenje smrživanjem	Turasan i sur., 2015
Eterično ulje	inulin	sušenje raspršivanjem	Fernandes i sur., 2014
Eterično ulje	polikaprolakton	nanopercipitacija	Khoobdel i sur., 2017
Eterično ulje	niskoviskozni alginat	ionsko geliranje	Dolça i sur., 2015
Eterično ulje	guma arabika, škrob	sušenje raspršivanjem	Fernandes i sur., 2014
Ekstrakt ružmarina	poloxamer	superkritični fluid	Visentin i sur., 2012
Ekstrakt ružmarina	maltodekstrin	sušenje raspršivanjem	Bunhez i sur., 2016
Ekstrakt ružmarina	kazein	emulzifikacija	Arranz i sur., 2015

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

U ovome radu korišten je suhi ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (berba 2015.) podrijetlom iz Hrvatske. Materijal je kupljen u specijaliziranoj trgovini ljekovitog bilja, Suban d.o.o. te je usitnjen i prosijan do određene veličine čestica.

Kao nosač za inkapsulaciju polifenolnih spojeva ružmarina korištena je natrijeva sol alginske kisline iz niske viskoznosti (Sigma-Aldrich Company Ltd. (Dorset, UK)). Ostali materijali koji su korišteni u sustavu alginatnih nosača su kakaov prah smanjenog udjela masti od 10-12 % (Zvečevo d.d., Požega, Hrvatska) te rogač (Šafram d.o.o., Zagreb, Hrvatska).

3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta ružmarina

Ekstrakt ružmarina pripremljen je prelijevanjem 20 g usitnjenog ružmarina s 200 mL destilirane vode, prethodno zagrijane na temperaturu od 80 °C. Ekstrakcija se provodila 30 minuta uz miješanje staklenim štapićem te održavanje konstantne temperature od 80 °C. Nakon ekstrakcije uzorak je procijeđen kroz metalno cijedilo i gazu te je nadopunjen do željenog volumena (200 mL) i ohlađen na sobnu temperaturu prije analiza. Ekstraktu ružmarina ispitan je bioaktivni profil u vidu određivanja udjela polifenola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta, dok je preostali dio ekstrakta ružmarina korišten za inkapsulaciju.

3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije su bile visoke analitičke (p.a.) čistoće.

Određivanje udjela ukupnih polifenola:

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina:

- Klorovodična kiselina (HCl), Kemika (Hrvatska)
- Arnow reagens – smjesa natrijevog nitrita (Gram-mol d.o.o.; Zagreb, Hrvatska) i natrijevog molibdata (Sigma-Aldrich; Steinham, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (NaOH), Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska)
- Kafeinska kiselina, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom:

- Etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica:

- Natrijeva sol alginske kiseline niske viskoznosti, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev citrat, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrij hidrogen *o*-fosfat bezvodni, Fisher Chemical (Loughborough, Velika Britanija)
- Natrij dihidrogenfosfat-dihidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela suhe tvari:

- Kvarcni pijesak (opran i žaren), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Aparatura i pribor

Priprema ekstrakta:

- Plamenik s azbestnom mrežicom
- Termometar

- Stakleni štapić
- Menzura volumena 250 mL
- Čaša volumena od 250 do 500 mL
- Štoperica
- Gaze
- Metalno cijedilo
- Električni mlin za kavu, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)

Spektrofotometrijske analize:

- Staklene epruvete
- Staklene čaše volumena 250 mL
- Staklene menzure volumena 50 mL, 100 mL, 500 mL
- Automatske mikropipete volumena 100-1000 μ L (Gilson, SAD)
- Staklene pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Propipete
- Odmjerne tikvice volumena 10-100 mL
- Stakleni štapići za miješanje
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Kivete od optičkog stakla (10 mm) za spektrofotometrijsko mjerenje
- Spektrofotometar Helios γ , ThermoSpectronic (Cambridge, Velika Britanija)

Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica:

- Igle od 27 G (0,4x13 mm)
- Plastične šprice volumena 2 i 5 mL
- Čaše volumena 50 do 250 mL
- Termometar
- Metalno cjedilo
- Plastične epice volumena 2 mL
- Plastične epruvete volumena 15 mL
- Magneti
- Aluminijske posudice s poklopcima
- Eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik, Tehtnica (Železnik, Slovenija)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Velika Britanija)
- Magnetna mješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)

- Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak=0,2 mm) (Naarden, Nizozemska)
- TA.HD.Plus analizator teksture, Stable Micro Systems (Velika Britanija)
- Cilindrična čelična sonda P/2, Stable Micro Systems (Godalming, Velika Britanija)
- Mikroskop Leica DM1000 LED (Cambridge, Velika Britanija)
- Kolorimetar, CM-700d, CM-A177, Konica Minolta (Tokio, Japan)

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfomolibdenske i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteau reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Pripremljeni uzorci se ostave stajati na sobnoj temperaturi dva sata, nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 µL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Za izračunavanje konačnog rezultata je potrebno apsorbanciju slijepa probe oduzeti od apsorbancije uzorka.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

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

Gdje su:

- x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)
- y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u dvije paralelene probe ($n = 2$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g uzorka ili čestica.

3.2.2. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

Princip metode:

Određivanje hidroksicimetnih kiselina bazira se na reakciji kiselinske hidrolize koja je popraćena nastankom ružičasto-crvenkastog obojenja, čiji se intenzitet određuje mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

Postupak rada:

500 μ L uzorka pomiješa se u staklenoj epruveti s 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline (HCl), 1 mL Arnow-og reagensa (10%-tna vodena otopina natrijevog nitrita i natrijevog molibdata), 1 mL 8,5%-tne vodene otopine natrijevog hidroksida (NaOH) te se doda 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se dobro izmiješa te se odmah očita apsorbancija na 490 nm (Matkowski i sur., 2008). Slijepa proba umjesto uzoraka sadrži destiliranu vodu.

Udjel hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,0026x + 0,0054$$

Gdje su:

- x – udjel kafeinske kiseline (mg/L),
- y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), konstruirane za standard kafeinske kiseline, određuje se udjel hidroksicimetnih kiselina u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

provedeno je u dvije paralelene probe ($n = 2$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg ekvivalenata kafeinske kiseline (KK)/g uzorka ili čestica.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.2.3.1. ABTS metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS⁺ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 μ L otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije ABTS⁺ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$. Volumen od 40 μ L uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS⁺ radikala u tamnoj epruveti te se nakon točno 6 minuta izmjeri apsorbancija na 734 nm. Prije mjerenja uzorka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 μ L vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,303x + 0,0006$$

Gdje su:

- x –koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol /L)
- y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a/g uzorka ili čestica.

3.2.3.2. DPPH metoda

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidacijskih svojstava temelji se na redukciji DPPH radikala(1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (517 nm). U prisutnosti elektron donora (antioksidans koji gasi slobodneradikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U tamnu epruvetu se otpipetira 100 μ L uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 minuta po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μ L metanola.

Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a/L) prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a.

Jednadžba baždarne krivulje:

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

Gdje su:

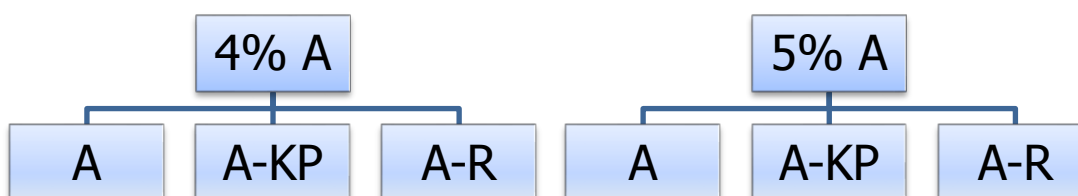
- x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol /L)
- y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a/g uzorka ili čestica.

3.2.4. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina u sustave nosača na bazi alginata ionskim geliranjem

Kao nosač za inkapsulaciju polifenola ružmarina korištene su 4%- i 5%-tne (w/v) otopine alginata niske viskoznosti. Uz sustave pripremljene samo s alginskom kiselom, pripremljena su još dva sustava, gdje se alginat (A) miješao s 20%-tnim (w/v) otopinama kakaovog praha (KP) ili rogača (R). Otopine alginata, kakaovog praha i rogača prije miješanja u odgovarajućem omjeru prethodno su otopljene u ekstraktu ružmarina, pri čemu su se otapale na magnetskoj mješalici 24 h pri sobnoj temperaturi. Nakon otapanja, otopine alginata miješane su s otopinama kakaovog praha i rogača u masenom omjeru 80:20 (w/w) te kao takve korištene za inkapsulaciju.

Pri tome su formirani sljedeći sustavi nosača na bazi alginata:



Slika 4. Shematski prikaz formuliranih sustava nosača za inkapsulaciju polifenola ružmarina

Za ionsko geliranje alginata u ovom istraživanju korišten je 3%-tni (w/v) kalcijev klorid koji je pripremljen otapanjem u ekstraktu ružmarina. Formiranje čestica provedeno je ukapavanjem alginatnih sustava nosača pomoću plastične šprice i igle od 27 G (0,4x13 mm) u prethodno pripremljene otopine za geliranje. Otopina za geliranje se prilikom ukapavanja miješala na magnetskoj mješalici, pri čemu je došlo do formiranja kapljica sferičnog oblika. Kada su formirane sve čestice, iste su ostavljene da se dodatno miješaju 30 minuta u gelirajućem mediju, pri čemu je došlo do očvršćivanja čestica. Čestice su zatim iz otopine kalcijeva klorida odvojene filtracijom, isprane ekstraktom i spremljene u ekstrakt na +4 °C do analiza. Nadalje, pripremljene su i kontrolne čestice, na način kao i prethodno opisani sustavi nosača na bazi alginata, koje su umjesto ekstrakta ružmarina sadržavale destiliranu vodu.

3.2.5. Karakterizacija čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

3.2.5.1. Određivanje udjela vode

Princip metode:

Ovim postupkom mjeri se masa suhe tvari nakon sušenja do konstantne mase. Sušenje se provodi na 105 °C jer pri toj temperaturi dolazi do izdvajanja slobodne vode iz uzorka. Udio suhe tvari izračunava se u odnosu na početnu masu uzorka koji se suši.

Postupak metode:

U prethodno osušene (do konstantne mase, pri 105 °C), ohlađene i izvagane aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom i poklopcem, odvagano je približno 0,5 g hidrogel čestica. Uzorak se u otklopljenim posudicama suši oko 3 sata u sušioniku pri 105 °C. Nakon isteka vremena sušenja, aluminijska posudica s uzorkom pokrije se poklopcem, prebaci u eksikator, gdje se hladi na sobnoj temperaturi te ohlađena važe na analitičkoj vagi. Postupak se ponavlja dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici ($\pm 0,0003$ g). Udjel vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema formuli:

$$\text{Udjel vode} = (a-b) \times 100/m (\%)$$

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

Gdje su:

- a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)
- b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

- m – masa uzorka (g)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 2 mjerenja ($n=2$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.5.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika

Veličina alginatnih hidrogel čestica određena je snimanjem čestica ($n=10$) digitalnim fotoaparatom na Dino-Lite kalibracijskoj pločici (min. razmak = 0,2 mm), iz čega je određena veličina čestica. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 10 mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

Analiza teksture provedena je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), opremljenom s utegom od 5 kg. Analize su provedene na sobnoj temperaturi na pet različitih hidrogel čestica svakog sustava. U svrhu postizanja maksimalnog omjera kompresije i smicanja, za probijanje uzoraka korištena je cilindrična čelična sonda P/2 (Stable Micro Systems, Velika Britanija) s ravnim dnom uz brzinu prodiranja od 0,5 mm/s. Dobiveni dijagrami obrađeni su u Texture Exponent programu (Stable Micro Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za ispitivane parametre teksture (tvrdoću i elastičnost). Tvrdoća uzorka izražena je kroz maksimalnu silu (N) potrebnu za kompresiju uzoraka, dok se maksimalna udaljenost sonde prilikom probijanja uzorka ispod krivulje (sile) koristi za računanje elastičnosti (mm). Elastičnost je izražena na 50% vrijednosti očitane za tvrdoću. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja ($n=5$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

Određivanje oblika i strukture dobivenih hidrogel čestica izvršeno je snimanjem čestica mikroskopom Leica DM1000 LED uz odgovarajuće povećanje.

3.2.5.3. Određivanje parametara boje

Određivanje boje uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan), pri čemu je dobivena reflektancija uzoraka u čitavom području vidljivog spektra te L^* , a^* i b^* vrijednosti. Nelinearni odnosi za L^* , a^* i b^* vrijednosti imaju zadatak imitirati logaritamski odgovor ljudskog oka. Ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koji su poznati kao plavi, zeleni i crveni receptori. Sukladno tome, L^* vrijednost je

osvjetljenje ili svjetlosna komponenta, koja ima vrijednosti u rasponu 1-100, dok su a^* (od zelene do crvene) i b^* (od plave do žute) dvije kromatske vrijednosti u rasponu od -120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007). Za potrebe analize, hidrogelovi dobiveni ionskim geliranjem preneseni su u odgovarajuće Petrijeve zdjelice promjera 30 mm, tako da se u potpunosti prekrije dno posudice i formira homogeni sloj uzorka. Područje mjerenja podešeno je na 400 do 700 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Kontrola mjerenja provedena je korištenjem računalne aplikacije SpectraMagic NX. Sva mjerenja izvršena su u SCI (eng. „*Specular Component Included*“) modu, koji predstavlja način mjerenja boje uzorka pri kojemu se uračunavaju sjene, tj. uzorak se prikazuje onako kako ga vidi ljudsko oko (Gökmen i Sügüt, 2007). Na temelju rezultata mjerenja, ukupna promjena boje (ΔE^*) u odnosu na referentni uzorak (čestice pripremljene samo s čistim alginskom (4% i 5%) u sustavu nosača) izračunata je prema formuli:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2}$$

Gdje su:

- ΔE^* - promjena boje ispitivanih uzoraka u odnosu na referentni
- L^* - svjetlina boje ispitivanog uzorka u $L^*a^*b^*$ sustavu
- a^* - parametar boje ispitivanog uzorka (crveno)
- b^* - parametar boje ispitivanog uzorka (žuto)
- L^*_{ref} - svjetlina boje referentnog uzorka – čestice pripremljene s alginskom
- a^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka – čestice pripremljene s alginskom
- b^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka – čestice pripremljene s alginskom

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri mjerenja ($n=3$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.5.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

Udjel ukupnih polifenola i hidroskimetnih kiselina, kao i antioksidacijski kapacitet u česticama na bazi alginata, određen je otapanjem poznate količine profiltriranih čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici, do potpune dezintegracije čestica.

Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteu reagensa (opisano u poglavlju 3.2.1.), udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u reakciji s Arnou-ovim reagensom (opisano u poglavlju 3.2.2.). Određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode opisano je u poglavljima 3.2.3.1. i 3.2.3.2.

Postotak inkapsulacije polifenolnih spojeva i zadržanog antioksidacijskog kapaciteta izračunat je kao omjer udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijskog kapaciteta u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih u početnim otopinama sustava nosača pripremljenih ekstraktu ružmarina.

3.2.5.5. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

Otpuštanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola i udjela hidroksicimetnih kiselina te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metoda (opisano u poglavljima 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3.1. i 3.2.3.2.). SGF i SIF pripremljene su prema protokolu europske farmakopeje (European Pharmacopeia 7.0, 2010), ali bez enzima pepsina i pankreatina. SGF se sastojao od natrijevog klorida i klorovodične kiseline (pH=1,2), dok je SIF odgovarao fosfatnom puferu (pH=7,4). Približno 0,6 g profiltriranih čestica suspendirano je u 30 mL SGF-a temperature 37 °C, pri čemu su čestice u SGF-u konstatno miješane na magnetskoj miješalici (podešenoj na 100 rpm)., U određenim vremenskim razmacima iz otopine je izuzimano 2 mL tekućeg medija do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 h te je nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama dodan alikvot od 2 mL SGF-a. Čestice su zatim filtriranjem uklonjene iz otopine SGF-a i prenesene u 30 mL SIF-a (37 °C) te konstantno miješane na magnetskoj miješalici (100 rpm). Postupak uzorkovanja alikvota tekućeg medija je ponovljen u određenim vremenskim razmacima kao i kod SGF-a, sve dok se čestice nisu u potpunosti dezintegrirale u SIF-u. U ovako dobivenim alikvotima od 2 mL određen je udjel ukupnih polifenola (mg ekvivalenata galne kiseline/g čestica), hidroksicimetnih kiselina (mg kafeinske kiseline/g čestica) i antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/g čestica). Pomoću dobivenih rezultata određen je profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz ispitivanih sustava nosača na bazi alginata s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.

3.2.5.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica

Povećanje mase bubrenjem (vezanjem vode) u liofiliziranim česticama praćen je provođenjem *Swelling* metode. 0,05 g liofiliziranih čestica preliveno je s 20 mL destilirane vode te miješano na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. U određenim vremenskim intervalima (na početku, nakon 30 minuta, 1, 2, 4, 6 i 24 sata) izmjerena je masa čestica. Čestice su uklonjene iz tekućeg medija filtriranjem pomoću lijevka i filter papira te posušene staničevinom, nakon čega su vagane na analitičkoj vagi.

Rezultati su prikazani kao omjer početne mase čestica i mase čestica nakon vezanja vode u određenom vremenskom periodu, koji se označava kao *Swelling ratio* (SR). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 2 mjerenja ($n=2$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je ispitivanje potencijala novih materijala u sustavu alginatnog gela, poput kakovog praha i rogača, koji do sada u svrhe inkapsulacije nisu korišteni. Također, u ovom radu ispitan je utjecaj koncentracije alginata (4% i 5%) na ispitivane parametre formuliranih hidrogel čestica.

Prvotno, ekstraktu ružmarina određen je udjelu kupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet primjenom ABTSi DPPH metoda te je prikazan u tablici 2. Formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina određen je udjel vode (slika 5) te fizikalne (tablica 3) i morfološke (slika 6 i 7) karakteristike. Parametri boje, poput svjetline hidrogel čestica, crvenog i žutog obojenja te ukupne promjene boje prikazani su u tablici 4. Utjecaj koncentracije alginata i dodatnih materijala u sustavu alginatnog gela na učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina ružmarina prikazani su na slici 8. a učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama na slici 9. Nadalje, praćen je profil otpuštanja ukupnih polifenola (slika 10), hidroksicimetnih kiselina (slika 11) i antioksidacijskog kapaciteta (slika 12 i 13) iz hidrogel čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Vežanje vode u liofiliziranim česticama s inkapsuliranim polifenolima ružmarina prikazano je u tablici 5.

4.1. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta ružmarina

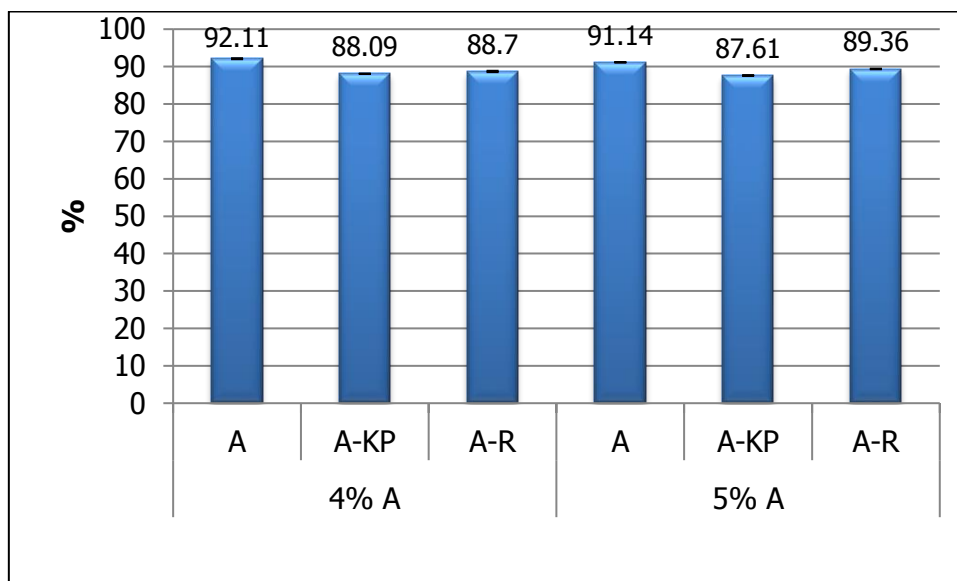
Tablica 2. Bioaktivni profil ružmarina

Uzorak	UP [mg EGK/g]	HCA [mg KK/g]	ABTS [mmol Trolox-a/g]	DPPH [mmol Trolox-a/g]
Ružmarin	73,12±1,90	76,62±0,14	0,34±0,01	0,28±0,01

U tablici 1. prikazan je udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet određen pomoću ABTS i DPPH metode.

Udjel ukupnih polifenola u ekstraktu ružmarina iznosio je 73 mg EGK/g uzorka. Nešto veći udjel ukupnih polifenola od 162 mg EGK/g ružmarina dobiven je u radu Erkana i suradnika (2008). Rezultati njihovog istraživanja mogu se pripisati primjeni druge ekstrakcijske tehnike i otapala, budući da su autori koristili ekstrakciju po Soxhletu uz primjenu metanola. Takvi ekstrakcijski uvjeti pokazali su se učinkovitijim za ekstrakciju polifenola ružmarina u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju vodom, korištenu u ovom radu. Udjel hidroksicimetnih kiselina iznosio je 76,62 mg KK/g uzorka. Antioksidacijski kapacitet određen je pomoću ABTS i DPPH metoda. Vrijednost dobivena za ABTS iznosila je 0,34 mmol Trolox-a/g uzorka, dok je antioksidacijski kapacitet određen primjenom DPPH metode bio nešto niži i iznosio 0,28 mmol Trolox-a/g uzorka. Viši antioksidacijski kapacitet određen s ABTS metodom je očekivan, budući da ABTS reagens reagira sa lipofilnim i hidrofilnim skupinama, dok DPPH radikal reagira samo s hidrofilnim skupinama (Sricharoen i sur., 2015). U radu Bubonja-Sonje i suradnika (2011) antioksidacijski kapacitet ružmarina određen primjenom DPPH metode bio je niži u odnosu na rezultate ovog istraživanja. Razlika u vrijednostima može se opet pripisati primjeni različitih otapala za ekstrakciju polifenola, budući da su Bubonja-Sonje i suradnici (2011) u svom radu koristili mješavinu vode, metanola i acetata.

4.2. Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina



Slika 5. Udjel vode (%) u formuliranim hidrogel česticama s inkapsulirani ekstraktom ružmarina

Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina prikazan je na slici 5. Najveći udjel vode sadrže čiste alginatne čestice, pri čemu je dodatak kakaovog praha i rogača u alginatni gel rezultirao smanjenim udjelom vode, neovisno o koncentraciji alginata. Dodatkom novih materijala (KP i R) popunio se prostor između čestica i time smanjio udjel vode unutar hidrogel mreže, što je potvrđeno i u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Čestice s 4%-tnim čistim alginatom imaju neznatno veći udjel vode (92,11%) u odnosu na iste pripremljene s 5%A (91,14%). Hidrogelovi pripremljeni s rogačem pokazuju nešto veći udjel vode u odnosu na iste pripremljene s kakaovim prahom. Ovakvi su rezultati u skladu s istraživanjem Tella i suradnika (2015), koji su dokazali da čestice alginatnog gela sadrže visoki udjel vode (94-96%).

4.3. Fizikalne i morfološke karakteristike hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

U Tablici 3. prikazane su fizikalne karakteristike hidrogel čestica, veličina čestica te tvrdoća i elastičnost, kao i utjecaj koncentracije alginata i sustava nosača na fizikalna svojstva alginatnih hidrogelova.

Tablica 3. Veličina i parametri teksture hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

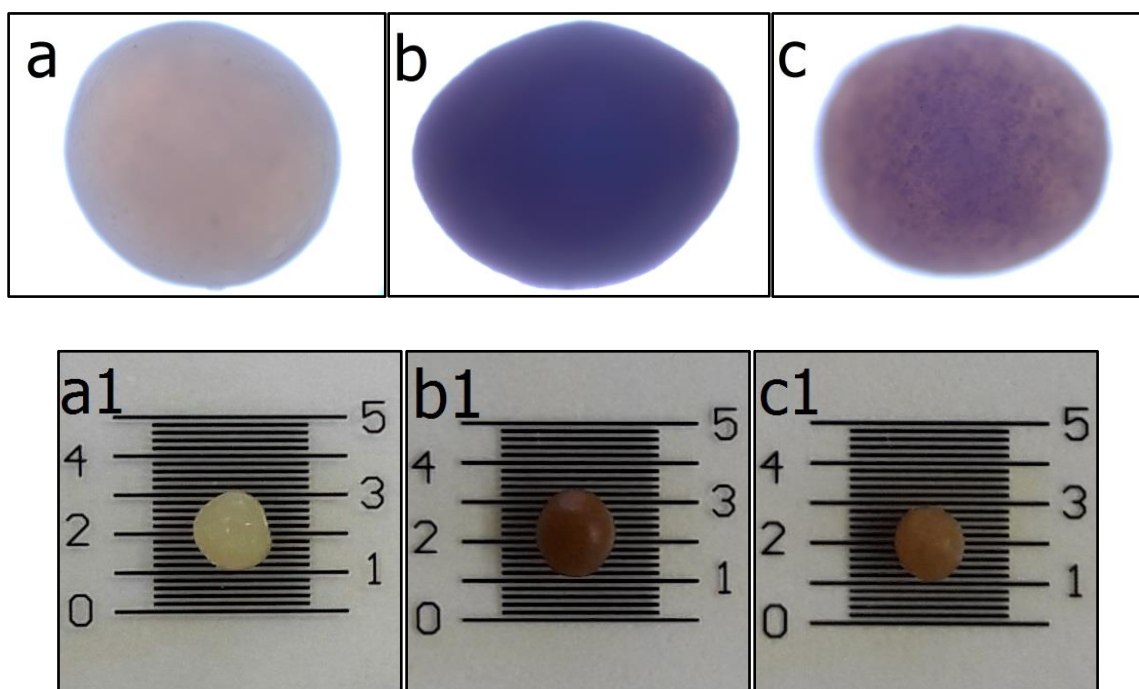
Noslač		Veličina (mm)	Tvrdoća (N)	Elastičnost (mm)
4%	A	2,00 ± 0,12	0,22 ± 0,00	0,32 ± 0,01
	A-KP	1,99 ± 0,10	0,13 ± 0,01	0,25 ± 0,01
	A-R	1,83 ± 0,13	0,16 ± 0,02	0,29 ± 0,04
5%	A	2,33 ± 0,19	0,24 ± 0,00	0,33 ± 0,00
	A-KP	2,21 ± 0,13	0,18 ± 0,01	0,31 ± 0,00
	A-R	2,18 ± 0,16	0,17 ± 0,01	0,29 ± 0,00

Uvidom u rezultate može se zaključiti da veća koncentracija alginata (5%) rezultira većom veličinom hidrogel čestica. Kod obje koncentracije alginata, najveće su bile čiste alginatne čestice, dok je dodatak KP i R u alginatni gel utjecao na smanjenje veličine čestica, gdje su najmanje bile čestice A-R (1,83 mm za 4%A i 2,18 mm za 5% A). Isti trend je uočen i u istraživanju koje su proveli Totosaus i suradnici (2013), gdje su formirane čestice s inkapsuliranim bakterijama mliječne kiseline pomoću alginata, u kombinaciji s gelanom i karagenanom, imale manji promjer u odnosu na čestice formirane s čistim alginatom.

Nadalje, iz Tablice 2. vidljivo je da je, kao i kod veličine čestica, veća koncentracija alginata (5%) rezultirala većim vrijednostima za tvrdoću te da su sukladno tome čestice pripremljene se 4% alginata bile mekše. Također, čiste alginatne čestice imale su najveću tvrdoću, dok su binarni sustavi, odnosno sustavi A-KP i A-R bili mekši, kod obje ispitane koncentracije alginata. Kod sustava s 4% A najmekši je bio uzorak A-KP (0,13 ± 0,01 N), a kod čestica s 5% A sustav A-R pokazao se kao najmekši (0,17 ± 0,01). Ovakvi rezultati su u skladu s istraživanjem Totosausa i suradnika (2013), koji su također dokazali da tvrdoća nije povećana dodavanjem dodatnih materijala u alginatni noslač.

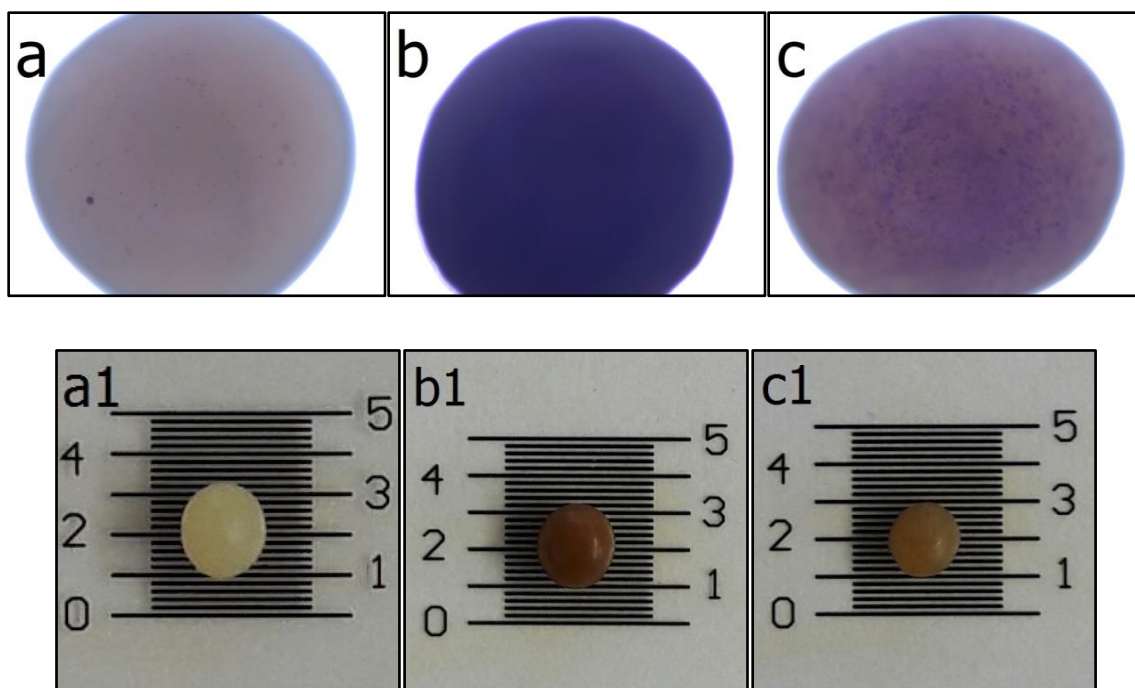
Analizom rezultata za elastičnost, uočeno je da su čestice s 5%-tnim alginatom bile elastičnije u usporedbi s 4%A. Dodavanjem kakaovog praha i rogača u alginatni noslač elastičnost čestica se smanjivala, pri čemu su čiste alginatne čestice bile najelastičnije (0,32 mm za 4% A i 0,33 mm za 5%A). Najmanju elastičnost kod čestica s 4% A imao je sustav A-KP (0,25 ± 0,01 mm), dok kod noslača s 5% A imao je sustav A-R (0,29 ± 0,00mm). Ovakvi su rezultati u skladu i s drugim prethodnim istraživanjima, poput onog Totosausa i suradnika (2013), koje je dokazao da dodatak gelan gume i karagenana u alginatni gel rezultira česticama veće elastičnosti od onih koje su formirane samo s natrijevim alginatom. Također,

u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), u kojem su čestice s inkapsuliranim kafeinom, pripravljene s alginatom u kombinaciji s kitozanom, pokazivale veću elastičnost u odnosu na one pripravljene s čistim alginatom, ali su čestice alginata s dodatkom *Psyllium* ljuskica pokazivale manju elastičnost od čestica s čistim alginatom.



Slika 6. Mikroskopska slika (a-c) hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina pripremljenih s 4%-tnim alginatom s pripadajućom slikom na kalibracijskoj pločici (a1-c1): a - čisti alginat, b - alginat i kakaov prah, c – alginat i rogač

Morfološke karakteristike hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina prikazane su na slikama 6 i 7. Koncentracija alginata nije imala velik utjecaj na morfološka svojstva ispitivanih čestica. Kod obje koncentracije alginata, čestice formirane samo s alginatom imale su najpravilniji i najsferičniji oblik u odnosu na ostale (5a i 6a). Dodatak kakaovog praha i rogača u alginatni sustav utjecao je nepovoljnije na morfološka svojstva, budući da je rezultirao nepravilnijim izgledom i manjom sferičnošću čestica, no i dalje morfološki izgled ovih čestica je zadovoljavajući. Dobiveni rezultati slažu se sa rezultatima dobivenim u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), gdje binarni sustavi alginatnih i pektinskih čestica također imaju nepravilniji izgled i smanjenju sferičnost u odnosu na čestice čistog alginata.



Slika 7. Mikroskopska slika (a-c) formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarinapripremljenih s 5%-tnim alginatom, s pripadajućim slikama na kalibracijskoj pločici (a1-c1): a - čisti alginat, b - alginat i kakov prah, c – alginat i rogač

4.4. Određivanje parametara boje u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

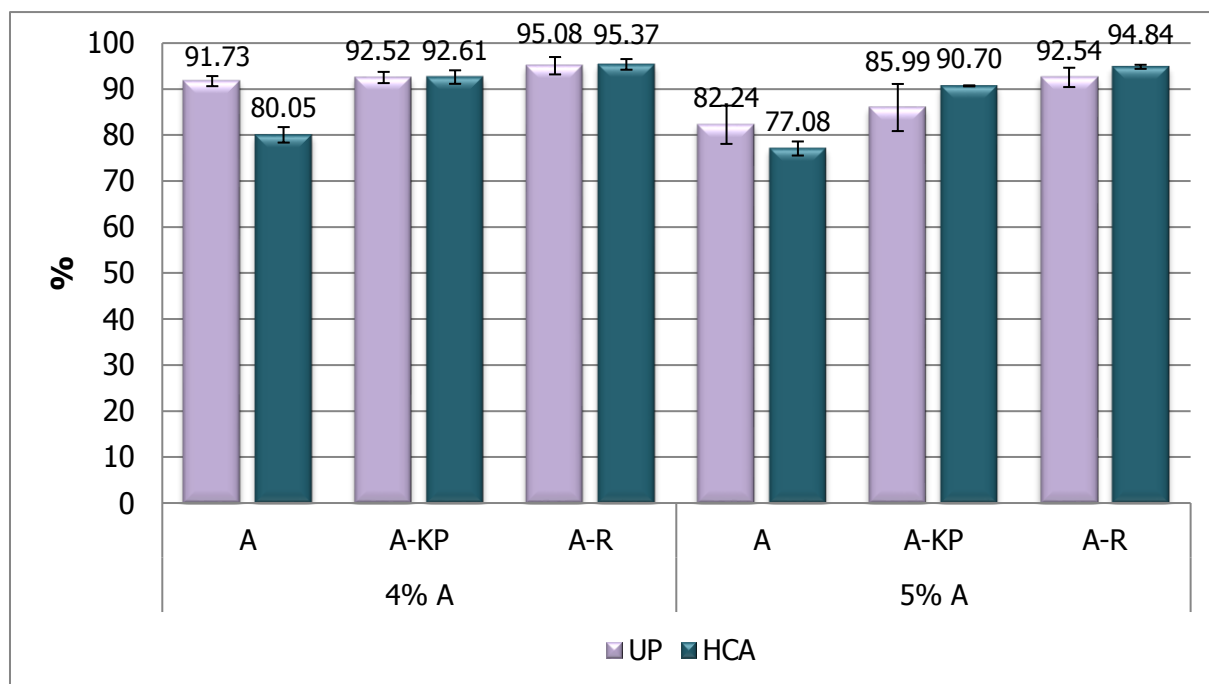
Tablica 4. Parametri boje alginatnih hidrogel čestica

Noslač		L^*	a^*	b^*	ΔE^*
4%	A	$52,75 \pm 0,06$	$1,98 \pm 0,16$	$22,56 \pm 0,11$	-
	A-KP	$26,73 \pm 0,10$	$11,21 \pm 0,04$	$17,13 \pm 0,32$	$28,04 \pm 0,08$
	A-R	$33,02 \pm 0,05$	$8,30 \pm 0,06$	$17,65 \pm 0,10$	$21,28 \pm 0,04$
5%	A	$58,88 \pm 0,09$	$1,93 \pm 0,09$	$21,99 \pm 0,07$	-
	A-KP	$27,10 \pm 0,03$	$10,95 \pm 0,03$	$16,27 \pm 0,06$	$33,53 \pm 0,04$
	A-R	$34,09 \pm 0,04$	$7,86 \pm 0,04$	$15,83 \pm 0,08$	$26,22 \pm 0,12$

U tablici 4 nalaze se izmjereni parametri svjetline (L^*), parametri boje ispitivanih uzoraka za crveno (a^*), parametri boje ispitivanih uzoraka za žuto (b^*) te izračunata ukupna promjena boje (ΔE^*) prema formuli iz poglavlja 3.2.5.3. u odnosu na referenti uzorak (4 i 5%-tni čisti alginat). Uvidom u rezultate za svjetlinu čestica, može se zaključiti da su čestice pripravljene s nižom koncentracijom alginata (4% A) bile tamnije u odnosu na iste formirane s 5% A, budući da su imale niže L^* vrijednosti. Kod obje koncentracije alginata, najsvjetliji uzorak bio je čisti alginat ($52,75 \pm 0,06$ za 4% A i $58,88 \pm 0,09$ za 5% A), dok je dodatak KP i R očekivano rezultirao tamnijim uzorkom. Uzorci pripravljeni s rogačem bili su svjetliji u odnosu na iste pripravljene s kakaovim prahom.

Među ispitivanim vrijednostima, kod sustava s 4% A i 5% A, najveće vrijednosti za parametar a^* , odnosno crveno obojenje imale su čestice s kakaovim prahom, dok su najveće vrijednosti za parametar b^* imale čestice čistog alginata, što ukazuje da je kod tih čestica očekivano najizraženije žuto obojenje. Najveća ukupna promjena boje (ΔE^*) određena je kod čestica s većom koncentracijom alginata (5%) te čestica s kakaovim prahom.

4.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina



Slika 8. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) i hidroksicimernih kiselina (HCK) u hidrogel česticama s imobiliziranim ekstraktom ružmarina

Na slici 8 prikazan je utjecaj koncentracije nosača i „jačanja“ alginatnog gela kakaovim prahom i rogačem na inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina ekstrakta ružmarina u hidrogel česticama.

Svi pripremljeni sustavi na bazi alginata pokazali su visoku inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina ružmarina, budući da su omogućili njihovu imobilizaciju u postotku većem od 77%.

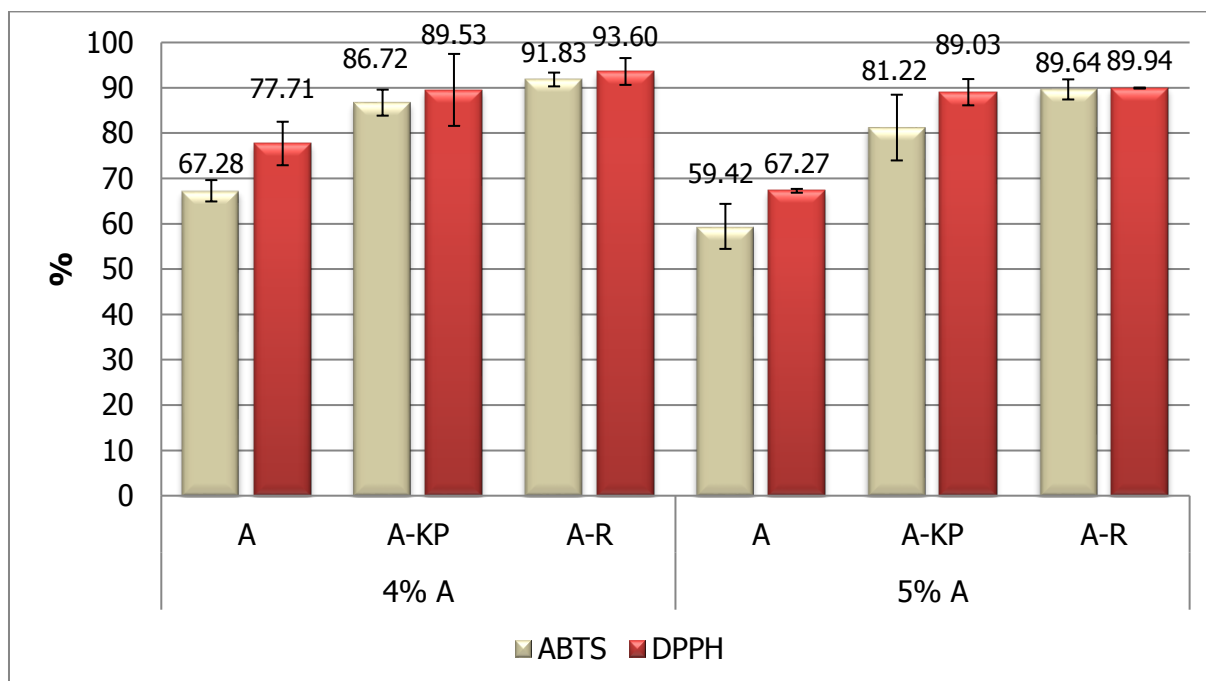
Sustavi pripremljeni s nižom koncentracijom alginata (4%) pokazali su se učinkovitijim za inkapsulaciju ukupnih polifenola ružmarina, u odnosu na iste pripremljene s većom koncentracijom alginata (5%), budući da je kod sustava s 4% A stupanj inkapsulacije polifenola bio nešto veći. Kod obje koncentracije alginata, inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola bila je veća nakon „jačanja“ alginatnog sustava nosača kakaovim prahom i rogačem, što opravdava dodatak ovih materijala u alginat, budući da su isti smanjili poroznost alginata i omogućili bolje zadržavanje ukupnih polifenola unutar binarnih sustava. Sukladno tome, alginat je imao najniži stupanj inkapsulacije ukupnih polifenola (91,73% - 4% A i 82,24% - 5% A). Među binarnim sustavima nosača, dodatak rogača pokazao se učinkovitijim u odnosu na kakaov prah, budući da je u obje koncentracije alginata omogućio bolje zadržavanje polifenola: 95,08% (R) >92,52% (KP) za 4% A i 92,54% (R) >85,99% (KP) za 5% A. Dobiveni rezultati slažu se s rezultatima koje su dobili Anbinder i suradnici (2011) u istraživanju gdje su čestice alginata s kitozanom bolje zadržavale polifenole ekstrakta Yerba mate tijekom simuliranih SGF uvjeta od čestica formiranih samo alginatom.

Isti trend, kao i kod inkapsulacije ukupnih polifenola ružmarina, bio je vidljiv i kod imobilizacije hidroksicimetnih kiselina u hidrogel čestice. I ovdje, niža koncentracija alginata pokazala se učinkovitijom za imobilizaciju hidroksicimetnih kiselina, kao i binarni alginatni sustavi (A-KP i A-R). Također, sustavi A-R imali su veću inkapsulacijsku učinkovitost hidroksicimetnih kiselina (95,37% - 4% A i 94,84% - 5% A) u odnosu na sustave A-KP (92,61% - 4% A i 90,70% - 5% A).

Ovakvi rezultati slažu se s istraživanjem koje su proveli Belščak-Cvitanović i suradnici (2016), gdje su zaključili da sustavi alginatnih nosača kojima su dodani pomoćni materijali, u njihovom slučaju izolati proteina sirutke, imaju veću učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih biljnih polifenolnih ekstrakata. To se može objasniti visokim afinitetom polifenola prema proteinima, čime se stvaraju potencijalne interakcije koje omogućuju uspješnu ugradnju polifenola u sustave nosača (Belščak-Cvitanović i sur., 2016).

Uspoređujući s rezultatima za veličinu čestica, vidljiv je obrnuto proporcionalan odnos između veličine čestice i inkapsulacijske učinkovitosti polifenola, budući da su najmanje

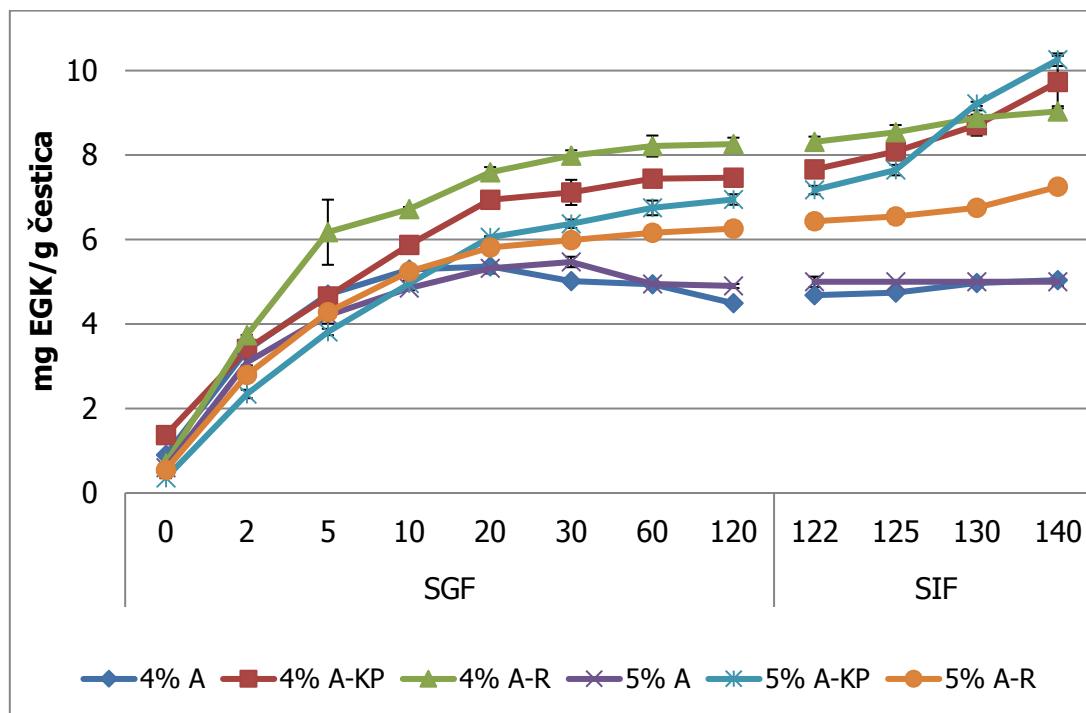
čestice (A-R) imale najveću učinkovitost imobilizacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, a najveće čestice (A) imale su najmanju inkapsulacijsku učinkovitost polifenola.



Slika 9. Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metoda u hidrogel česticama s imobiliziranim ekstraktom ružmarina

Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina provedeno je ABTS i DPPH metodama, te su dobiveni rezultati prikazani na slici 9. Bolje zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta kod ABTS i DPPH metoda opet su pokazali sustavi pripremljeni s 4% A. Također, iz rezultata se može zaključiti da, kao i kod inkapsulacije polifenolnih spojeva, kod obje korištene koncentracije alginata (4% A i 5% A), dodatak pomoćnih materijala (KP i R) u sustav alginatnih nosača povećava sposobnost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta. Najveću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodama imali su alginatni sustavi s rogačem - 91,83% (4%A-R), određen ABTS metodom, te 93,60% (4% A-R) ispitan primjenom DPPH reagensa.

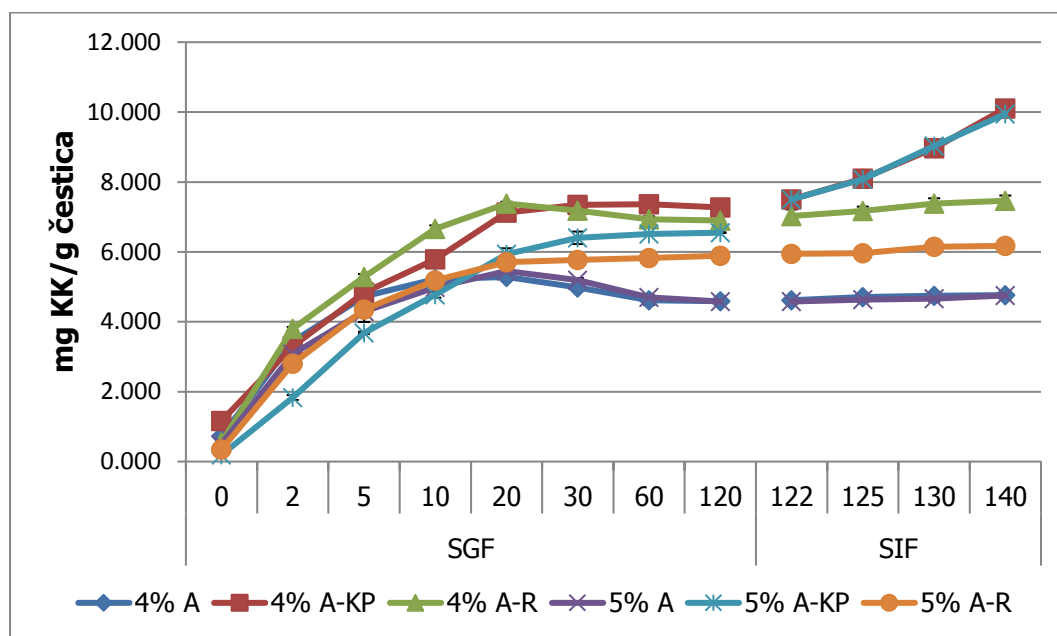
4.6. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina



Slika 10. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg EGK/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u simuliranim gastrointestinalnim fluidima

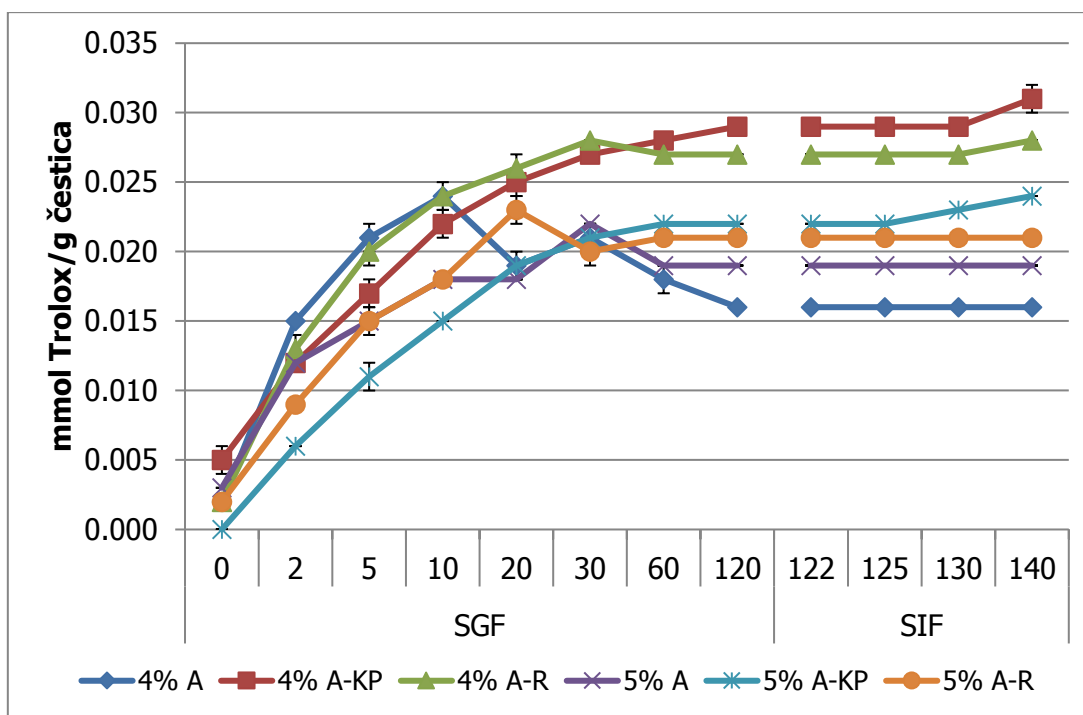
Prikaz profila otpuštanja ukupnih polifenola iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima prikazan je na slici 9. Među svim ispitivanim sustavima, najbrži profil otpuštanja ukupnih polifenola iz čestica imali su sustavi pripremljeni s čistim alginatom. Sustav s 4% A pokazao je kontinuirano otpuštanje do 20 min, dok je sustav s 5% A postepeno otpuštao polifenole do 30 min u uvjetima SGF-a, nakon čega slijedi ravnotežno stanje koje se nastavilo i nakon prebacivanja čestica u SIF, kod oba sustava. Dodatak KP i R u alginatni omotač omogućio je produljeno otpuštanje ukupnih polifenola iz čestica u gastrointestinalnim uvjetima kroz svih 140 min, za obje korištene koncentracije alginata. Kod tih sustava ukupni polifenoli su se prvo kontinuirano otpuštali kroz 120 min gastričnog fluida da bi se nastavili kontinuirano otpuštati i u intestinalnom fluidu do 140 min. Najveći udjel ukupnih polifenola nakon 140 min otpuštanja u SIF-u imali su sustavi A-KP praćeni sa sustavima A-R. Kod čestica s KP, u 140 min otpustilo se 9,73 mg EGK/g čestica kad se koristio 4% A te 10,26 mg EGK/g čestica(5% A).

Produljeno otpuštanje ukupnih polifenola čestica pasje ruže (*Rosa canina*) pripremljenih ionskim geliranjem kada je alginat kombiniran s dodatnim kitozanskim omotačem potvrđeno je i u istraživanju Stoice i suradnika (2013).



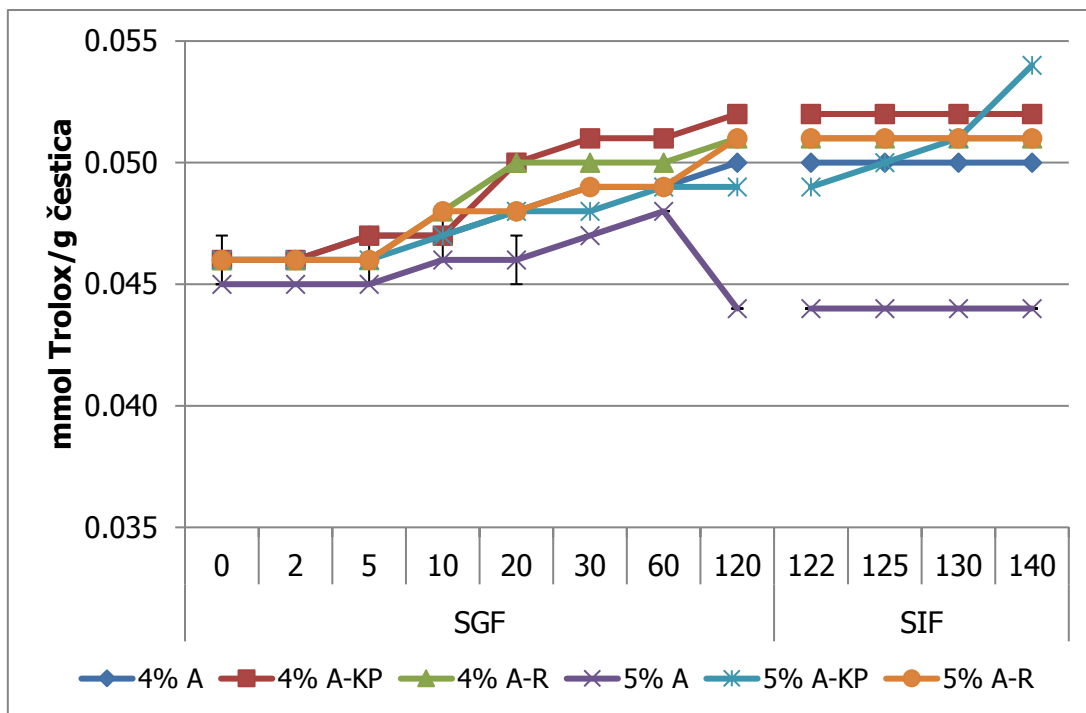
Slika 11. Profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (mg KK/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u simuliranim gastrointestinalnim fluidima

Na slici 11 prikazan je profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz hidrogel čestica s imobiliziranim ekstraktom ružmarina u simuliranim SGF i SIF uvjetima. I ovdje, najbrži profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz čestica imale su čestice pripremljene samo s alginatom, dok su „pojačani“ alginatni sustavi (A-KP i A-R) pokazali sporije otpuštanje istih. Čiste alginatne čestice, kod obje koncentracije, pokazale su kontinuirano otpuštanje hidroksicimetnih kiselina do 20 min u SGF-u, nakon čega tijekom analize više nije zabilježeno njihovo otpuštanje. Kod alginatnih gelova s KP, kod obje koncentracije alginata, hidroksicimetne kiseline su se kontinuirano otpuštale kroz svih 140 min simuliranog gastrointestinalnog fluida, s 10,11 mg KK/g čestica (4% A) i 9,95 mg KK/g čestica (5% A). Što se tiče binarnih sustava s rogačem, kod 5% A-R također je zabilježeno postepeno otpuštanje hidroksicimetnih kiselina kroz svih 140 min SGF-a i SIF-a, dok su se iste kod 4% A-R otpuštale do 20 min SGF-a, a nakon prebacivanja u SIF pokazale su opet neznatno kontinuirano otpuštanje.



Slika 12. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u simuliranim gastrointestinalnim fluidima, određen ABTS metodom

Na slici 12 prikazan je profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica primjenom ABTS metode. Iz rezultata vidljivo je da je najbrže otpuštanje kod čestica s čistim alginatom (4% A i 5% A). Binarni sustavi s KP, u SGF-u pokazuju polagano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta do 60 min (5% A) te kroz 120 min za sustav s 4% A, nakon čega se postiže ravnotežno stanje, sve do 130 min (5% A) i 140 min (4% A) u SIF-u, gdje je opet zabilježen lagani porast u otpuštanju antioksidacijskog kapaciteta. Kod alginatnih gelova s rogačem (A-R), sustav s 4% A otpuštao je antioksidacijski kapacitet kroz 30 min gastričnog fluida te ostao ujednačen do 130 min u SIF-u. Sustav 5% A-R otpuštao je antioksidacijski kapacitet do 60 min SGF-a te ostao ravnotežan do kraja analize. Bušić i suradnici (2016) inkapsulirali su polifenole gljive *Ganoderma lucidum* u alginatnim hidrogelovima s dodatkom zeina i izolata proteina sirutke. Autori su također odredili uspješnije zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta u binarnim sustavima nosača u odnosu na čiste alginatne sustave.



Slika 13. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u simuliranim gastrointestinalnim fluidima, određen DPPH metodom

Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta određeno DPPH metodom, prikazano je na slici 13, a odvija se brzo kod svih sustava, pri čemu se vrlo brzo postiže uravnoteženo stanje, uz pojedine fluktuacije. Isto takvo brzo otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u polimernim sustavima uočeno je u istraživanju koje su proveli Ionita i suradnici (2015), gdje se mjerio antioksidacijski kapacitet DPPH metodom inkapsuliranog ekstrakta ružmarina na nosačima β -citodekstrina i glicerola.

U odnosu na čestice formirane samo s čistim alginatom, dodatak kakaovog praha i rogača u alginat usporio je otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogelova. Općenito, u SIF uvjetima nije dolazilo do dodatnog otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta, osim kod uzorka 5% A-KP, gdje je nakon prebacivanja u intestinalni fluid vidljivo kontinuirano otpuštanje do 140 minute, pa je kod tih čestica i zabilježen najveći antioksidacijski kapacitet od 0,054 mmol Trolox-a/g uzorka. Upravo ovaj uzorak je imao najsporiji profil otpuštanja, budući da je jedini omogućio kontinuirano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta kroz 140 min u gastrointestinalnom fluidu.

4.7. Povećanje mase liofiliziranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina nakon vezanja vode

Tablica 5. Omjer povećanja mase nastale uslijed vezanja vode u liofiliziranim česticama

Nosáč	4%					
	SR _{30min}	SR _{1h}	SR _{2h}	SR _{4h}	SR _{6h}	SR _{24h}
A	2,146±0,015	2,158±0,037	2,199±0,009	2,312±0,05	2,352±0,022	2,378±0,014
A-KP	2,411±0,035	2,648±0,012	2,657±0,026	2,865±0,034	2,997±0,005	3,055±0,027
A-R	2,621±0,014	2,688±0,030	2,705±0,010	2,931±0,009	2,954±0,021	2,960±0,009
Nosáč	5%					
	SR _{30min}	SR _{1h}	SR _{2h}	SR _{4h}	SR _{6h}	SR _{24h}
A	2,473±0,051	2,584±0,038	2,667±0,008	2,776±0,007	2,762±0,046	2,787±0,012
A-KP	2,111±0,078	2,215±0,082	2,306±0,069	2,349±0,098	2,398±0,087	2,507±0,137
A-R	2,658±0,187	2,826±0,288	2,853±0,267	2,976±0,327	3,025±0,364	3,334±0,505

SR* - Swelling ratio, omjer bubrenja mase

Omjer povećanja mase liofiliziranih čestica uslijed bubrenja (vezanja vode) prikazan je u tablici 5. Kod svih ispitivanih sustava može se uočiti povećanje omjera mase tijekom vremena, uz pojedine fluktuacije (5% A), a najveći omjer povećanja mase zabilježen je nakon 24 h bubrenja u vodenom mediju, kod svih uzoraka. Nakon 24 h bubrenja, veći stupanj bubrenja imale su čestice pripravljene s 5% alginata, uz iznimku sustava A-KP. Također, dodatak KP i R u alginatnu gel mrežu rezultirao je većim omjerom bubrenja, osim kod sustava 5% A-KP, gdje je zabilježen niži SR ($SR_{24h} = 2,507$) u odnosu na čisti alginatni gel ($SR_{24h} = 2,787$). Najveći omjer bubrenja pokazao je sustav 5% A-R, gdje je SR nakon 24 h iznosio 3,334.

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak kakaovog praha i rogača u alginatni gel rezultirao je smanjenjem udjela vode u formiranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.
2. Veća koncentracija alginata (5%) utjecala je na povećanje veličine hidrogel čestica. Dodatak kakaovog praha i rogača, u alginat rezultirao je smanjenjem veličine čestica, pri čemu su najmanje bile čestice pripremljene s rogačem (1,83 mm).
3. Veća koncentracija alginata rezultirala je tvrdim, ali elastičnijim česticama, dok su binarni sustavi alginatnih nosača bili mekši, ali manje elastični. Najveće čestice (čisti alginatni sustavi) imale su najveću tvrdoću i bili su najelastičnije.
4. Dodatak kakaovog praha i rogača u alginatnu gel mrežu negativnije se odrazio na morfološka svojstva čestica, budući da su isti imali nepravilniji oblik i bili manje sferični. Utjecaj koncentracije alginata na morfološke karakteristike hidrogel čestica nije bio značajan.
5. Dodatak kakaovog praha i rogača u alginat rezultirao je smanjenom svjetlinom čestica, a najveću ukupnu promjenu boje pokazale su čestice s kakaovim prahom. Čestice s manjom koncentracijom alginata (4%) imale su manju ukupnu promjenu boje.
6. Dodatak kakaovog praha i rogača u alginatni gel rezultirao je povećanjem inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te boljim zadržavanjem antioksidacijskog kapaciteta, pri čemu je sustav nosača A-R imao najveći stupanj inkapsulacije istih. Niža koncentracija alginata (4%) pokazala se učinkovitijom za imobilizaciju polifenolnih spojeva ružmarina.
7. Obrnuto proporcionalan odnos zamijećen je između veličine čestica i inkapsulacijske učinkovitosti, budući da su najmanje čestice imale i najveći stupanj inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina.
8. Dodatak kakaovog praha i rogača u alginatni sustav nosača rezultirao je sporijim otpuštanjem polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina. Najsporiji profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina pokazali su sustavi A-KP, gdje su se ispitivani spojevi kontinuirano otpuštali kroz svih 140 min u simuliranom gastrointestinalnom fluidu, neovisno o koncentraciji alginata.
9. Kakaov prah i rogač, kao nove, do sada neispitane sirovine u sustavu nosača za inkapsulaciju, pokazale su jako velik potencijal za inkapsulaciju polifenolnih spojeva.

6. LITERATURA

Abid M., Jabbar S., Wu T. (2013) Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry* **21**: 93 - 97.

Anal A. K., Singh H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Science & Technology* **18**: 240 - 251.

Anbinder P.S., Deladino L., Navarro A.S., Amalvy J.I., Martino M.N. (2011) Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences* **1**: 1-8.

Arranz E., Santoyo S., Jaime L., Fornari T., Reglero G., Guri A., Corredig M. (2015) Improved Bioavailability of Supercritical Rosemary Extract Through Encapsulation in Different Delivery Systems After In Vitro Digestion. *Food Digestion: Research and Current Opinion* **6**: 30 - 37.

Bell L.N. (2001) Stability testing of nutraceuticals and functional foods. U: Handbook of nutraceuticals and functional foods, CRC Press, New York, str. 501 - 516.

Belščak-Cvitanović A., Bušić A., Barišić L., Vrsaljko D., Karlović S., Špoljarić I., Vojvodić A., Mršić G., Komes D. (2016) Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloid* **57**: 139 - 152.

Belščak-Cvitanović A., Komes D., Karlović S., Djaković S., Špoljarić I., Mršić G., Ježek D. (2015) Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. *Food Chemistry* **167**: 378 - 386.

Bohn, T. (2014), Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews* **7**: 429 - 452.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berseti C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* **28**: 25 - 30.

Bubonja-Sonje M., Giacometti J., Abram M. (2011) Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry* **127**: 1821 - 1827.

Bušić A. , Belščak-Cvitanović A. , Wang Y., Vojvodić A. , Karlović S. , Špoljarić I., Mršić G., Veršec1 , Jasmina Vučilovski P. , Komes D. (2016) Application of whey protein isolates and

zein for the formulation of alginate-based delivery systems encapsulating *Ganoderma lucidum* polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **8 (2)**: 99 - 106.

Calin-Sanchez A., Szummy A., Figiel A., Jaloszynski K., Adamski M., Carbonell Barrachina A. A. (2011) Effects of Vacuum Level and Microwave Power on Rosemary Volatile Composition during Vacuum-microwave Drying. *Journal Food Engineering* **103**: 219-227.

Charve J., Reineccius G.A. (2009) Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **57**: 2486 - 2492.

Choi U. K., Lee O. H., Yim J. H., Cho C. W., Rhee Y. K., Lim S. I. (2010) Hypolipidemic and antioxidant effects of dandelion (*Taraxacum officinale*) root and leaf on cholesterol-fed rabbits. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 67 - 78.

Costa C. , Utan A., Speroni E., Cervellati R., Piva G., Prandini A., Guerra M. C. (2007). Carnosic acid from rosemary extracts: a potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An in vitro study. *Journal of Applied Toxicology* **27**: 152 - 159.

Cuvelier M. E., Richard H., Berset C. (1996). Antioxidative Activity and Phenolic Composition of Pilot-Plant and Commercial Extracts of Sage and Rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**: 645 - 652.

de Vos P., Faas M. M., Spasojevic M. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* **20**: 292 - 302.

Desai K. G. H., Park H. J. (2005a) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **23**: 1361 - 1394.

Dolça C., Ferrándiz M, Capablanca L., Franco E., Mira E, López F., García D. (2015) *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences* **5**: 121 - 130.

Donbrow M. (1991) *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*. CRC Press, Boca Raton.

Đorđević V., Balanč B., Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V. (2014) Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews* **7**: 452 - 490.

- Ephrem E., Greige-Gerges H., Fessi H , Charcosset C. (2014) Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal of Microencapsulation* **31(8)**: 746 - 753.
- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* **110**: 76 - 82.
- Fang Z., Bhandari B. (2010) Encapsulation of polyphenols – A review. *Trends in Food Science Technology* **21**: 510 - 523.
- Fernandes R. V. B., Borges S.V., Botrel D. A. (2014) Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers* **101**: 524 - 532.
- Fernandes R. V. B., Borges S.V., Botrel D. A., de Oliveira C. R. (2014) Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein–inulin blends as carriers. *International Journal of Food Science and Technology* **49**: 1522 - 1529.
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International* **40**: 1107 - 1121.
- Ghosh, S. K. (2006). Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. U: S. K. Ghosh, Functional Coatings by Polymer Microencapsulation. Weinheim: Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co., str 1 - 29.
- Gökmen V., Sügüt I. (2007) Computer-vision Based Analysis of Colour as a Tool for Food Process Control. U: Focus on food engineering research and development, Pletney V. N., ured., Nova Publishers, New York, str. 17 - 27.
- Hardman W.E. (2014) Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice* **8**: 233 - 240.
- Hertog M. G., Feskens E. J., Hollman P. C., Katan M. B., Kromhout D. (1993) ,Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet* **342**: 1007 - 1011.

Ionita P., Dinoiu V., Munteanu C., Turcu I.M., Tecuceanu V., Zaharescu T., Oprea E., Ilie C., Anghel D., Ionita G., (2015) Antioxidant activity of rosemary extracts in solution and embedded in polymeric systems, *Chemical Papers* **69 (6)**: 872 - 880.

Jyothi S., Seethadevi A., Suria Prabha K., Muthuprasanna P., Pavitra P. (2012) Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **3**: 509 - 531.

Khoobdel M., Ahsaei S. M., Farzaneh M. (2017) Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with *Rosmarinus officinalis* essential oil in *Tribolium castaneum* (Herbst): Insecticidal activity of nanocapsules. *Entomological Research* **47**: 175 - 184.

Kim C. K., Lee E. J. (1992) The controlled release of blue dextran from alginate beads. *International Journal of Pharmaceutics* **79**: 11 - 19.

King A. H. (1995) Encapsulation of Food Ingredients: A review of available technology, focussing on hydrocolloids. U: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients. ACS Symposium Series 590, Sara J. Risch and Gary A., ur., Reineccius. American Chemical Society, Washington DC, str. 26 -39.

Kosaraju S. L. (2005) Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**: 251 - 258.

Kuang S. S., Oliveira J. C., Crean A. M. (2010) Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **50**: 951-968.

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

Lakkis J.M. (2007) Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, 1. izd., Blackwell Publishing.

Lalou S., Mantzouridou F., Paraskevopoulou A., Bugarski B., Levic S., Nedovic V. (2013) Bioflavour production from orange peel hydrolysate using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 9397 - 9407.

Li L., Fang Y., Vreeker R., Appelqvist I. (2007) Reexamining the Egg-Box Model in Calcium-Alginate Gels with X-ray Diffraction. *Biomacromolecules* **8**: 464-468

- Lugman S., Rizvi S.I. (2006). Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytotherapy Research* **20**: 303 - 6.
- Matkowski A., Tasarz P., Szyplula E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research* **2(11)**: 321 - 330.
- Matsuyama K., Mishima K., Hayashi K. I., Matsuyama H. (2003) Functional coatings and Microencapsulation: A General Perspective. *Journal of Nanoparticle Research* **19**: 87 - 95.
- Meer W. (1980a) Gum Arabic. U: Davidson RL, Handbook of water-soluble gums and resins. McGraw-Hill, New York, str. 8-21.
- Munin A., Edwards-Lévy (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **3**: 793 - 829.
- Nedović V., Kalušević A., Manojlović V., Lević S., Bugarski B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* **1**: 1806 - 1815.
- Oluwatuyi M., Kaatz G. W., Gibbons S. (2004) Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry* **65**: 3249 - 3254.
- Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **5**: 270 - 278.
- Park K., Sharaby W. S. W., Park H. (1993) "Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery", Technomic Publishing, P. A. Lancaster, str. 99 - 140.
- Peng Y., Yuan J., Liu F., Ye J. (2005) Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **39**: 431-437.
- Racoviță Ș., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie* **54**: 709 - 718.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231 - 1237.

Reis C. P., Neufeld R. J., Vilela S., Ribeiro A. J., Veiga F. (2006) Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation* **23 (3)**:245 - 257.

Rezaie T., McKercher S. R., Kosaka K., Seki M., Weehler L., Viswanath V., Chun T., Joshi R., Valencia M., Sasaki S., Tozawa T., Satoh T., Lipton A. S. (2012) Protective Effect of Carnosic Acid, a Pro-Electrophilic Compound, in Models of Oxidative Stress and Light-Induced Retinal Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **53 (12)**: 7847 - 7854.

Rouse I. L., Beilin L. J., Armstrong B. K., Vandongen R. (1983) Blood-pressure-lowering effect of a vegetarian diet: controlled trial in normotensive subjects, *Lancet* **1**: 5 - 10.

Shofian N. M., Hamid A. A., Osman A. (2011) Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 4678 - 4692.

Singh M. N., Hemant K. S. Y., Ram M., Shivakumar H. G. (2010) Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences* **55**: 65 - 77.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 - 179.

Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144 - 158.

Sosulski F., Krygier K., Hogge L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**: 337 - 340.

Sricharoen P., Techawongstein S., Chantai S. (2015) Determination of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Activities in the Crude Extracts of Ten Varieties of Tomatoes. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology* **20 (1)**: 66 - 74.

Stocker R. Keane Jr. J. F. (2004), Role of oxidative modifications in atherosclerosis, *Physiological Reviews* **84**: 1381 - 1478.

- Stoica R., Pop S. F., Ion R. M. (2013) Evaluation of natural polyphenols entrapped in calcium alginate beads prepared by the ionotropic gelation method. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **15**: 893 - 898.
- Tabak C., Arts I. C. W., Smit H. A., Heederik D., Kromhout D. (2001) Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **164**: 61 - 64.
- Tan H. L., Chan W. L., Heng S. W. P. (2009) Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. *Journal of Microencapsulation* **26**: 263–271.
- Tello F., Falfan-Cortés R. N., Martines-Bustos F., Martins da Silva V., Hubinger, Grosso C. (2015) Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloid* **43**: 670-678.
- Tena M.T., Valcarcel M., Hidalgo R.J., Uberta J.L. (1997) Determination of the Carnosic Acid Content in Wild and Cultivated Rosmarinus officinalis. *Food Chemistry* **69**: 521 - 526.
- Thies C. (2005) Microencapsulation. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4 izdanje, str. 317 - 327.
- Totosaus A., Ariza-Ortega T., Pérez-Chabela M. (2013) Lactic acid bacteria microencapsulation in sodium alginate and other gelling hydrocolloids mixtures. *Journal of Food and Nutrition Research* **52**: 107-120.
- Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* **2**: 1231 - 1246.
- Turasan H., Sahin S., Sumnu G., (2015) Encapsulation of rosemary essential oil, *Food Science and Technology* **1**: 112 - 119.
- Visentin A. B., Rodríguez-Rojo S., Navarrete A., Maestri D., Cocero M.J. (2012) Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process. *Journal of Food Engineering* **109**: 9 - 15.
- Viuda-Martos J., Rúa-Navajas Y., Sánchez-Zapata E., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. (2010) Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal* **25**: 13–19.

- Vladislavljevic, G.T. (2012) Encapsulation techniques. U: Encyclopedia of membranes, Drioli E., Giorno L., ured., Heidelberg: Springer Reference, str. 11 - 13.
- Wandrey C., Bartkowiak A., Harding E. S. (2010) Materials for Encapsulation. U: Zuidam N.J., Nedovic V.A ur., Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing. Springer, str. 31 - 100.
- Wang W., Wu N., Zu Y. G., Fu Y.J. (2008). Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components, *Food Chemistry* **108**:1019 - 1022.
- Wang X., Zhao J. (2013) Encapsulation of the Herbicide Picloram by Using Polyelectrolyte Biopolymers as Layer-by-Layer Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 3789 - 3796.
- Willfort R. (2002) Ljekovito bilje i njegova upotreba, 1. izd., Erudit. str.371
- Yang C. S., Landau J. M., Huang M. T., Newmark HL (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition* **21**: 381 - 406.
- Yong-Lee K., Hong-Yuk S. (2007) Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science* **32**: 669- 697.
- Young S.L., Sarda X., Rosenberg M. (1993) Microencapsulationproperties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milkfat. *Journal of Dairy Science* **76**: 2868 - 2877.
- Zhu G., Xiao Z., Zhou R., Yi, F. (2012) Fragrance and flavor microencapsulation technology. *Advanced Materials Research* **535**: 440 - 445.
- Zuidam N. J., Shimoni E. (2010) Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. U: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing. Zuidam, N. J., Nedovic, V. A., ur., Springe, str. 3 - 29.
- Zuidam N. J., Heinrich J. (2010) Encapsulation of aroma, U: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing, Springer, str. 127 - 160.

Izjava o izvornosti

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



ime i prezime studenta