

# Inkapsulacija ekstrakata origana dobivenih visokonaponskim električnim pražnjenjem

---

Švaljek, Silvija Lea

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:305171>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Silvija Lea Švaljek**

7654

**Inkapsulacija ekstrakata origana dobivenih  
visokonaponskim električnim pražnjenjem**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja” (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

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

**Zagreb, 2021.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za opće programe**

**Laboratorij za održivi razvoj**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

## **INKAPSULACIJA EKSTRAKATA ORIGANA DOBIVENIH VISOKONAPONSKIM ELEKTRIČNIM PRAŽNENJEM**

**Silvija Lea Švaljek, 0058213303**

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je inkapsulirati ekstrakt origana dobiven uz pomoć visokonaponskog električnog pražnjenja te pratiti otpuštanje aktivnih tvari iz dobivenih kapsula. Također, ispitani su i fizikalni parametri dobivenih kapsula. Dvije vrste kapsula bile su načinjene od alginata te kombinacije alginata i kitozana. Preostale dvije vrste sadržavale su kombinaciju alginata i taninske kiseline te alginata, taninske kiseline i kitozana. Dobiveno je ukupno četiri različitih vrsta kapsula. Tijekom 120 min otpuštanja praćene su koncentracije polifenola te je utvrđeno kako kapsule koje sadržavaju alginat i taninsku kiselinu imaju najveće vrijednosti. Otpuštanja su se provodila u dva medija, klorovodičnoj kiselini i vodi, te nisu zamijećene značajne razlike. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako bi se dobivene kapsule mogle ukomponirati u prehrambene proizvode.

**Ključne riječi:** ekstrakcija, inkapsulacija, origano, polifenoli, visokonaponsko električno pražnjenje

**Rad sadrži:** 26 stranica, 9 slika, 5 tablica, 40 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. Anet Režek Jambrak

**Pomoć pri izradi:** mag. nutr. Marinela Nutrizio

**Datum obrane:** 8. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology**

**Department for General Programmes**

**Laboratory for Sustainable Development**

**Scientific area: Biotechnical sciences**

**Scientific field: Food Technology**

### **ENCAPSULATION OF OREGANO EXTRACTS MADE BY HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGE**

**Silvija Lea Švaljek, 0058213303**

**Abstract:** The aim of this study was to encapsulate oregano extract obtained by high voltage electrical discharge. Also, the release of bioactive compounds from the encapsulates as well as their physical compounds had been observed. Two types of encapsulates were made of alginate and combination of alginate and chitosan. The other two encapsulates contained a combination of alginate and tannic acid as well as combination of alginate, tannic acid and chitosan. Four different types of encapsulates were made. During 120 min, a release of polyphenols concentration has been observed. It was determined that the encapsulates made of alginate and tannic acid had the highest amounts. Releasing was performed in two solvents, water and hydrochloric acid, and no significant differences were noticed. Obtained results showed that the encapsulates could be used in food products.

**Keywords:** extraction, encapsulation, oregano, polyphenols, high voltage electrical discharge

**Thesis contains:** 26 pages, 9 figures, 5 tables, 40 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, Anet Režek Jambrak, Full Professor

**Technical support and assistance:** Marinela Nutrizio, MSc, Research Assistant

**Defense date:** July 8th, 2021.

Sadržaj:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Origano .....	2
2.1.1. Kemijska svojstva origana .....	2
2.2. Ekstrakcija .....	4
2.2.1. Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem ( <i>High voltage electrical discharge</i> , HVED).....	5
2.3. Inkapsulacija .....	7
2.3.1. Inkapsulacijske tehnike .....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. Materijali .....	11
3.1.1. Uzorci .....	11
3.1.2. Reagensi.....	11
3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor .....	11
3.2. Metode rada .....	12
3.2.1. Priprema ekstrakata .....	12
3.2.2. Inkapsulacija .....	13
3.2.3. Otpuštanje polifenola iz kapsula.....	14
3.2.4. Metoda određivanja ukupnih polifenola.....	14
3.2.5. Metoda određivanja ukupnih flavonoida.....	15
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	15
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	16
3.2.8. Analiza teksture kapsula .....	16
3.2.9. Mjerenje promjera kapsula .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
5. ZAKLJUČAK .....	22
6. LITERATURA .....	23

## 1. UVOD

Iz dana u dan prehrambena industrija dolazi do novih spoznaja. Inovativnim tehnikama nastoje se proizvesti kvalitetniji i nutritivno bogatiji proizvodi. Zajedno s razvojem industrije postignut je i značajan napredak u educiranju potrošača o zdravom načinu života. Povećana je zainteresiranost za zdravstvenim dobrobitima biljaka odnosno za bioaktivne komponente koje se u njima nalaze. Upravo je briga za potrošače i okoliš potaknula znanstvenike na kreiranje alternativnih metoda izdvajanja bioaktivnih komponenti u cilju što većeg očuvanja istih (Ameer i sur., 2017).

Konvencionalne metode ekstrakcije zamijenjene su modernim metodama pri čemu je smanjena degradacija poželjnih komponenti, manje je iskorištenog otapala, manja je mogućnost zagađenja i slično. Kao jedna od takvih metoda ističe se ekstrakcija uz pomoć visokonaponskog električnog pražnjenja, ali i druge poput ultrazvuka ili mikrovalne ekstrakcije (Chemat i sur., 2015; Đurović i Đorđević, 2011)

Također, u svrhu očuvanja ekstrakata primjenjuje se metoda inkapsulacije koja omogućava kontrolirano otpuštanje ekstrahiranih komponenti, a također se uspješno maskiraju neugodni mirisi i okusi što je vrlo bitna stavka kod potrošača. Inkapsulacijske tehnike koje se primjenjuju su sušenje raspršivanjem, ekstruzija, oblaganje u fluidiziranom sloju, koacervacija i druge (Zuidam i Nedović, 2010).

Cilj ovog završnog rada bio je istražiti tehnike ekstrakcije te usporediti konvencionalne i nekonvencionalne metode. Poblizje je opisana i ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem te je na taj način eksperimentalno provedena ekstrakcija. Također su istražene i metode inkapsulacije te vrste nastalih kapsula. Eksperimentalno je izvršena inkapsulacija biljnog ekstrakta origana te je praćeno zadržavanje fenola u kapsulama i fizikalni parametri dobivenih kapsula. U samom ekstraktu praćene su koncentracije fenola i flavonoida te antioksidacijska aktivnost.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Origano

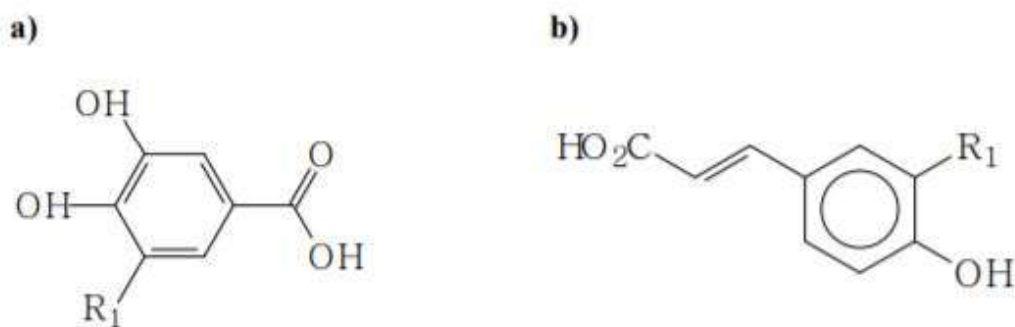
Origano (*Origanum vulgare* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*). Rasprostranjena je po južnoj Europi, najviše na mediteranskom podneblju, te u dijelovima Azije. Raste na sunčanim i polusjenovitim područjima, suhim livadama, hranjivim tlima te svijetlim listopadnim šumama, crnogoričnim šumama i šikarama. Građu biljke karakterizira razgranata drvenasta stabljika te peteljkasti dlakavi listovi. Upravo žljezdane dlačice na listovima sadržavaju hlapiva i esencijalna ulja koja su zaslužna za specifičnu aromu i miris origana (Kintzios, 2012). Zbog spomenute arome i mirisa, origano stoji kao jedna od najpoznatijih i ekonomski najvažnijih kulinarskih biljaka na svijetu. Prepoznatljiv je kao začín korišten na pizzi, mesu, različitim varivima te u umacima. Osim tradicionalne upotrebe origana u hrani, posebna pažnja posvećuje se i kemijskim spojevima te njihovim benefitima za ljudsko zdravlje (Yan i sur., 2016; Kintzios, 2012).

#### 2.1.1. Kemijska svojstva origana

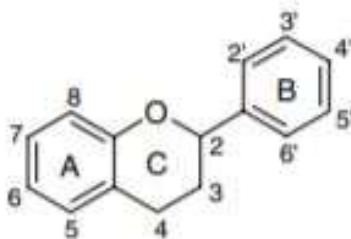
Biljka origana spominje se i u narodnoj medicini za liječenje stanja poput astme, bronhitisa, kašlja, probavnih smetnji, menstrualnih tegoba, dijabetesa, upalnih procesa i drugih. Benefiti iz origana pripisuju se fitokemikalijama koje se dobivaju iz sekundarnog metabolizma biljaka te služe biljci za obranu od nametnika, ultravioletnog (UV) zračenja te oksidativnog stresa. Također, navedeni spojevi utječu i na čovjeka (Gutiérrez-Grijalva i sur., 2018).

Fitokemikalije se prema svojim hidrofilnim i hidrofobnim svojstvima mogu podijeliti u dvije kategorije – esencijalna ulja i fenolni spojevi (Gutiérrez-Grijalva i sur., 2018). U esencijalnim uljima najviše su zastupljeni terpenoidi od čega se posebno ističu timol i karvakrol. Detektirani su i linalol, terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinen,  $p$ -cimen, no u manjim koncentracijama (Yan i sur., 2016). Fenolni spojevi su spojevi u kojima je hidroksilna skupina direktno vezana na benzenski ili aromatski prsten. Ukoliko su prisutne dvije ili više hidroksilnih skupina, radi se o polifenolima. Od fenolnih spojeva u origanu najviše su prisutne fenolne kiseline koje se dijele u dvije osnovne skupine – derivate hidroksicimne kiseline i derivate hidroksibenzojeve kiseline (Vuolo i sur., 2019). U origanu je u većoj mjeri zabilježena hidroksicimna kiselina. Flavonoidi se, ovisno o broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti te stupnju oksidacije centralnog C-prstena, dijele na flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, flavanole ili katehine, antocijanidine i čalkone (Panche i sur., 2016).

U origanu nalazimo najviše flavona. Zahvaljujući svim prethodno navedenim spojevima, origano se ističe kao biljka značajnih antioksidacijskih, antiupalnih i antikancerogenih svojstava. Konkretno, flavoni su pokazali neuroprotektivno, antiupalno, antioksidacijsko i antiasmatično djelovanje te mogućnost snižavanja rizika od kardiovaskularnih bolesti. Hidroksicimetna kiselina ističe se antioksidativnim, antikancerogenim i antidijabetičkim djelovanjem (Gutiérrez-Grijalva i sur., 2018). Na slici 1 prikazane su fenolne kiseline prisutne u origanu, dok je na slici 2 prikazana osnovna struktura flavonoida.



Slika 1. Kemijske strukture fenolnih kiselina prisutnih u origanu: a) hidroksibenzojeva kiselina, b) hidroksicimetna kiselina (Rocha i sur., 2012)

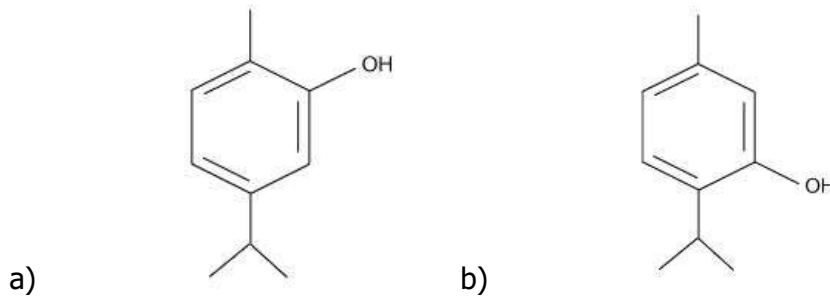


Slika 2. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Martens i Mithöfer, 2005)

Od nutritivnih karakteristika valja spomenuti vrlo značajne količine vitamina E, vitamina B6, riboflavina, niacina i biotina te relativno visoke količine vitamina C, tiamina i karotena. Minerali prisutni u biljci su kalcij, kalij, magnezij, fosfor, cink i mangan. Također, Azzouz i Bullerman (1982) u radu navode kako mljeveni origano pokazuje antifungalna svojstva. Dobri rezultati postignuti su u borbi protiv čestih kontaminanata hrane, točnije plijesni *Penicillium citrinum*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus flavus* i drugih. Antibakterijska



svojstva su manje istraživana, no pokazalo se kako ekstrakt origana inhibira rast nekih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija što se povezuje s timolom i karvakrolom prisutnim u origanu (Kintzios, 2012). Na slici 3 prikazane su kemijske strukture timola i karvakrola.



Slika 3. Kemijske strukture spojeva prisutnih u esencijalnom ulju origana: a) timol, b) karvakrol (Kintzios, 2012)

Biološki aktivne komponente prisutne u origanu zahtijevaju optimalan tretman u svrhu što boljeg očuvanja istih. To uključuje tzv. „zelene“ odnosno održive postupke ekstrakcije.

## 2.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija u kojoj dolazi do odjeljivanja tvari iz krute ili kapljevite smjese uz pomoć selektivnog otapala. Zasniva se na različitoj topljivosti tvari u različitim otapalima koja se ne miješaju. Veliku važnost predstavlja ekstrakcija biljnih materijala što se pripisuje bioaktivnim komponentama prisutnim u njima. Bioaktivne komponente primjenu nalaze u prehrambenoj industriji, medicini, kemijskoj industriji, farmaceutici, a prvi korak prema njihovoj primjeni predstavlja upravo ekstrakcija. Pritom valja izabrati povoljno otapalo te povoljnu metodu ekstrakcije kako ne bi došlo do gubitaka. Izbor otapala ovisi o prirodi komponente koja se izdvaja. Ukoliko su one hidrofilne koriste se polarna otapala poput vode, etanola, metanola, etil-acetata. Za lipofilne komponente primjenjuje se diklormetan, heksan, mješavina diklormetana i metanola u omjeru 1:1 (Sasidharan i sur., 2011). Uz otapalo, parametri koji utječu na uspješnost procesa ekstrakcije su temperatura, tlak, dio biljke te vrijeme kontakta (Azmir i sur., 2013).

Za održivost te očuvanje komponenti, posebice termolabilnih sastojaka, važan je izbor metode. Razlikujemo konvencionalne i nekonvencionalne (moderne) metode ekstrakcije. Konvencionalne, klasične metode uključuju ekstrakciju uz otapalo pri povišenoj temperaturi

i/ili uz miješanje. Neke od tih metoda su maceracija, infuzija, dekokcija, perkolacija te Soxhlet ekstrakcija (Chemat i sur., 2012; Azmir i sur., 2013). Nedostaci navedenih metoda su korištenje velikih količina otapala, gubitak analita zbog puno koraka procesa, dugotrajnost i visoka cijena (Đurović i Đorđević, 2011). Iz tih razloga sve se više primjenjuju nekonvencionalne, moderne metode koje svoje uporište pronalaze u zelenoj kemiji. Cilj zelene kemije je smanjenje otpada, korištenje sigurnijih otapala te osiguravanje sigurnijih uvjeta ekstrakcije, korištenje obnovljivih izvora energije te prevencija zagađenja (Chemat i sur., 2015). Primjeri takvih inovativnih metoda su mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ubrzana ekstrakcija otapalima, ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, mikroekstrakcija u krutoj fazi, ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem (eng. *High voltage electrical discharge*, HVED) (De Monte i sur., 2014; Đurović i Đorđević, 2011; Azmir i sur., 2013; Giacometti i sur., 2018).

#### 2.2.1. Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem (*High voltage electrical discharge*, HVED)

Jedna od sve češće korištenih nekonvencionalnih metoda ekstrakcije je ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED). Navedena metoda ističe se kao efikasna netopljinska metoda zelene ekstrakcije te spada pod tehnologiju pražnjenja u tekućoj fazi (Li i sur., 2019). Ona omogućuje povećanje brzine te smanjenje vremena difuzije i temperature potrebne za difuziju uz nizak unos energije. Vrlo se često kao otapalo koristi voda, dok se ekstrakcija vrši iz biljnog materijala. HVED u vodi pokreće kemijske reakcije zajedno s fizikalnim procesima pri čemu dolazi do prijenosa energije kroz plazma kanal između dvije nasuprotne elektrode (Bousetta i Vorobiev, 2014).

Formiranje električnog pražnjenja dijeli se na dvije faze. Prva faza naziva se „*streamer*“ faza ili „*pre-breakdown phase*“ u kojoj dolazi do stvaranja elektrovodljivog kanala ioniziranog plina. Stvaraju se slabi udarni valovi te mali broj mjehurića u vodi. Međutim prelaskom u drugu, „*arc*“ ili „*breakdown*“ fazu, dolazi do naglog porasta jačine struje. Nakon toga slijedi pražnjenje odnosno pad jačine struje uz oslobađanje energije. Time se stvaraju jači udarni valovi, nastaje veći broj mjehurića, dolazi do formiranja jake turbulencije i slobodnih radikala te emisije UV zračenja. Dolazi do oštećenja strukture deoksiribonukleinske kiseline, fragmentacije, mehaničke destrukcije staničnih tkiva te oštećenje stanica oksidacijom uzrokovanom radikalima što omogućuje prijelaz unutarstaničnog materijala u otopinu (Žuntar i sur., 2019; Bousetta i Vorobiev, 2014; Li i sur., 2019).

Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem može se podijeliti u tri kategorije. To su šaržni, kontinuirani i kružni tipovi ekstrakcije. Princip rada je isti te u svima dolazi do pojave pražnjenja zbog jakog električnog polja čime se vrši ubrzan prijenos mase te oštećenje staničnog materijala. U svom radu Li i sur. (2019) opisuju tri tipa spomenute ekstrakcije.

Šaržni (eng. *batch*) tip ekstrakcije uključuje igličastu elektrodu s pozitivnih nabojem. Kada je pulsirajući napon dovoljno velik dolazi do pojave pražnjenja u vodenoj otopini. Do pražnjenja dolazi zbog visokog intenziteta električnog polja koncentriranog u elektrodi te ono uzrokuje već spomenute udarne valove, turbulenciju, emisiju UV zračenja te formiranje radikala pri čemu dolazi do oštećenja stanica i difuzije unutarstaničnog materijala u otopinu.

Kontinuirani (eng. *continuous*) tip oduzima manje vremena te se ne koriste elektrode u obliku igle već elektrode s paralelnim disk mrežicama od nehrđajućeg čelika. Promjer između elektroda iznosi 20 mm te se napon vrši na jednoj elektrodi, dok je druga uzemljena. Zbog same građe elektroda mogućnost pražnjenja je puno manja te je potrebno poduzeti mjere koje će koncentrirati električno polje. Postavlja se izolacijska ploča s manjom rupom promjera 1 mm u sredini. Takva struktura omogućuje jače električno polje odnosno u samoj rupi je električno polje veće nego u ostalim dijelovima reaktora. S obzirom na to da se napon ne koncentrira na elektrodama, izbjegava se mogućnost korozije materijala.

Treći tip ekstrakcije odnosno kružni (eng. *circulating*) tip sastoji se od generatora, reaktora, transportne jedinice i ekstrakcijskog tanka. Zidovi reaktora građeni su od izolacijskih polikarbonata te se na vrhu nalazi manja rupa koja omogućuje regulaciju tlaka unutar i izvan reaktora. Elektroda je građena u obliku igle te se ispod nje nalazi prsten od nehrđajućeg čelika. Elektroda je postavljena tako da se vrh igle nalazi u sredini prstena. Zatim se primjenjuje visoki napon na iglu, dok je prsten uzemljen, te je u samom centru prstena intenzitet električnog polja vrlo visok. Nakon toga slijedi pražnjenje. Takav tip ekstrakcije omogućava veće kapacitete uz malo područje tretiranja čime se povećava efikasnost procesa i reducira potrošnja energije.

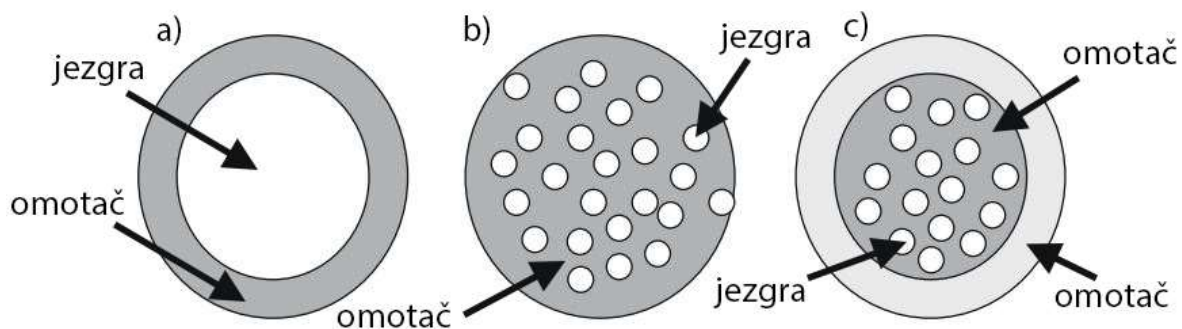
Ekstrakcija uz pomoć visokonaponskog električnog pražnjenja odlikuje se brojnim prednostima. Visoka efikasnost oštećenja stanica omogućuje i veće iskorištenje procesa, kraće vrijeme ekstrakcije i manju potrošnju energije. Za razliku od konvencionalnih metoda utrošak otapala je znatno manji. Visoka temperatura općenito uništava membrane stanica i ubrzava difuziju, ali isto tako može degradirati termolabilne bioaktivne komponente. Iz tog razloga prikladno je korištenje nižih temperatura koje omogućuje upravo ovaj proces. Osim toga, zabilježen je i porast antioksidacijske aktivnosti ekstrahiranih komponenti. No, unatoč

brojnim prednostima, ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem suočava se i s nekim nedostacima. Prvi je stvaranje slobodnih radikala. Oni uzrokuju oksidativno oštećenje stanica koje omogućuje difuziju unutarstaničnog materijala, međutim isti taj efekt može prouzročiti oksidaciju ciljanih komponenti koje se ekstrahiraju te time sniziti iskorištenje procesa. Sam proces je manje selektivan i trenutno nije prikladan za korištenje u industriji u velikim kapacitetima (eng. *scale-up*) (Li i sur., 2019).

### 2.3. Inkapsulacija

Proces pakiranja čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala unutar drugog materijala naziva se inkapsulacija te kao konačni proizvod dobivamo kapsule veličine od nekoliko nm do nekoliko mm. Tehnika inkapsulacije iznimno je bitna jer omogućava bolju stabilnost komponenti, maskiranje okusa i mirisa, raznolikost aroma te povećanja biodostupnosti. Jedna od takvih komponenta su antioksidansi bogati polifenoli koji su zbog svojih svojstava važni za ljudsku prehranu, ali su i također vrlo osjetljivi na svjetlo i toplinu. U slobodnoj su formi slabo topljivi u vodi te se brzo eliminiraju iz ljudskog tijela. Smanjena je stabilnost istih te biodostupnost te njihovo cjelokupno djelovanje. Izvrstan način očuvanja polifenola predstavlja spomenuta inkapsulacija unutar matriksa ili membrane. Cilj procesa je da bioaktivne komponente ostanu u svojoj aktivnoj formi u probavnom traktu te da se spriječi interakcija s ostalim komponentama hrane (Arriola i sur., 2016; Zuidam i Nedović, 2010).

Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, aktivno sredstvo, punjenje ili unutarnja faza, dok se tvar u koju se inkapsulira naziva membrana, ljuska, nosač, vanjska faza ili matriks. Tvar u koju se inkapsulira najčešće je prehrambeni materijal. Također, razlikujemo dva osnovna tipa kapsula. Prvi tip predstavljaju pojedinačne čestice (eng. *reservoir type*) i matriks tip (eng. *matrix type*). Pojedinačne čestice karakterizira ljuska oko aktivnog sredstva te se nazivaju i monojezgrene odnosno mononuklearne kapsule. Pod utjecajem povišenog tlaka može doći do loma takvih kapsula te ispuštanja komponenta te se iz tog razloga više primjenjuje matriks tip kapsula. Matriks tipovi se još nazivaju i polijejgrene odnosno polinuklearne kapsule pri čemu je aktivno sredstvo dispergirano unutar nosača. Ono se nalazi u formi kapljica ili je na molekularnoj razini jednoliko raspoređeno unutar kapsule. Često se primjenjuju i dodatni omotači. Oblik kapsula je uglavnom sferičan, ali se pojavljuju i ovalni, nepravilni i cilindrični oblici. Glavna zadaća kapsula je da pod određenim uvjetima ispuštaju komponente koje se nalaze unutar njih (Zuidam i Nedović, 2010; Fang i Bhandari, 2010). Na slici 4 prikazane su osnovne vrste kapsula.



Slika 4. Osnovne vrste kapsula: a) pojedinačni tip, b) matrics tip, c) matrics tip s dodatnim omotačem (Zuidam i Nedović, 2010)

Prednosti korištenja inkapsulacijskih tehnika su brojne. Ono omogućuje maskiranje neželjenih okusa i mirisa te regulaciju svojstava aktivnih komponenti što uključuje regulaciju veličine čestica, strukture, topljivosti u vodi ili ulju, boje i drugo. Zatim, mogućnost kontroliranog otpuštanja te povećanu stabilnost u konačnom proizvodu i tijekom proizvodnje gdje ne dolazi do degradacije ili reakcije s drugim komponentama, kisikom ili vodom. Zapaljivost hlapljivih komponenti je reducirana pri čemu je povećana i sigurnost procesa, omogućen je dulji rok trajanja, a aktivno sredstvo je nepomično unutar kapsule. Također je moguće i prilagoditi neka fizikalna svojstva poput topljivosti ili teksture što olakšava samu upotrebu, a proces ima i povoljan utjecaj na okoliš s obzirom na to da dolazi do smanjenja toksičnih tvari (Zuidam i Nedović, 2010).

Nedostatke inkapsulacije također treba uzeti u obzir. To su dodatni troškovi te povećana složenost procesa. Zatim, promjene u stabilnosti kapsula pri neadekvatnoj izvedbi procesa ili pri skladištenju u nepovoljnim uvjetima. Također, potrebno je voditi računa i o tome na koji način uklopiti kapsule u prehranu kako ne bi došlo do neželjenog zapažanja kapsula u hrani odnosno proizvodu od strane potrošača (Zuidam i Nedović, 2010; Shishir i sur., 2018; Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

### 2.3.1. Inkapsulacijske tehnike

Dobivanje optimalnih kapsula zahtijeva korištenje različitih inkapsulacijskih tehnika. Neke od njih uključuju sušenje raspršivanjem, ekstruziju, oblaganje u fluidiziranom sloju,

koacervaciju, molekularnu inkluziju, liposome, emulzije i druge (Shishir i sur., 2018; Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

#### 2.3.1.1. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem jedna je od najstarijih, a ujedno i jedna od najčešćih tehnika inkapsulacije. Funkcionira tako da se tekućina atomizira u struji vrućeg plina te se preko mlaznice prevodi u prah. Tekućina koja se koristi najčešće je u obliku emulzije, suspenzije ili otopine, dok je plin najčešće zrak te rjeđe inertni plin ili dušik. Prvo je potrebno pripremiti smjesu koja se želi inkapsulirati te odabrati sredstvo u kojem se provodi inkapsulacija. Slijedi šaržno oblaganje čestica te se takva smjesa uvodi u uređaj za raspršivanje gdje se raspršuje u struji vrućeg zraka. Vrijeme sušenja i veličina čestica ovisit će o veličini kapljica odnosno o površinskoj napetosti i viskoznosti tekućine, padu pritiska na mlaznici i brzini zraka. Sušenje raspršivanjem omogućuje i mikrobiološku stabilnost, smanjenje troškova skladištenja i transporta, smanjena je mogućnost kemijske i biološke degradacije. Također, dobiva se proizvod sa specifičnim karakteristikama poput instantne topljivosti. Ograničenja ove tehnike su korištenje ljepljivih i vlažnih sredstava. Dobivene čestice su uglavnom sferičnog oblika, veličine 10 do 100  $\mu\text{m}$  (Gharsallaoui i sur., 2007; Fang i Bhandari, 2010; Zuidam i Nedović, 2010).

#### 2.3.1.2. Oblaganje u fluidiziranom sloju

Tehnika oblaganja u fluidiziranom sloju uključuje pripremu otopine za oblaganje koja se zatim uvodi u sapnicu. Sapnicom se otopina za oblaganje raspršuje u uređaju te oblaže fluidizirane čestice. Struja zraka omogućuje podizanje čestica koje se oblažu. Materijal koji se koristi za oblaganje mora imati prihvatljivu viskoznost, mora biti pogodan za atomizaciju te stvoriti omotač na površini čestice i mora biti termostabilan. Najčešće se koriste vodene otopine celuloznih derivata, dekstrina, proteina, guma i škrobova. Vrlo je popularno korištenje Würster tehnologije pri čemu se materijal za oblaganje uvodi odozdo. Oko 80 % struje zraka koncentrirano je u sredini, dok je ostatak na periferiji. To omogućuje cirkulaciju čestica praha pri čemu se reducira aglomeracija te ubrzava vrijeme sušenja (Zuidam i Nedović, 2010).

#### 2.3.1.3. Ekstruzija

Ekstruzija je tehnika u kojoj se otopina biopolimera ispušta kroz mlaznicu u drugu otopinu u kojoj dolazi do geliranja. U laboratorijskim uvjetima otopina se injektira u drugu otopinu te se takav sistem može primijeniti i u industriji. Ekstruzija uključuje inkapsulaciju različitih

komponentata, i hidrofobnih i hidrofilnih. Tehnika se pokazala dobrom pri inkapsulaciji esencijalnih ulja iz morskih izvora, voća, povrća, sjemenki, cvijeća te korova. Međutim, problem mogu predstavljati velike čestice porozne strukture zbog teže kontrole otpuštanja i stabilnosti procesa (Shishir i sur.,2018).

#### 2.3.1.4. Koacervacija

Koacervacija je tehnika separacije hidrokoloida iz početne otopine i naknadno taloženje formiranog koacervata oko aktivnog sredstva koji je suspendiran ili emulgiran u istoj otopini. Može se provesti jednostavna koacervacija koja uključuje jedan omotač ili složena koja uključuje više omotača, najčešće želatinu i gumu arabiku. Složenom koacervacijom dobivaju se uglavnom nedefinirani oblici te je relativno skupa metoda pri inkapsulaciji komponenata hrane. Međutim, navedena tehnika pokazala se povoljnom pri inkapsulaciji polifenola gdje se ono pozitivno odražava na stabilnost i kvalitetu istih (Fang i Bhandari, 2010; Zuidam i Nedović, 2010).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorci

Korišten je osušeni origano (*Origanum vulgare* L.) tvrtke Suban d.o.o. (Samobor, Hrvatska). Uzorci su skladišteni na tamnom i suhom mjestu u polietilenskim vrećama.

##### 3.1.2. Reagensi

Korišteni su sljedeći reagensi: Folin-Ciocalteu reagens, natrijev karbonat, vodena otopina klorovodične kiseline (pH=1,64), citratni pufer (pH=8,36), natrijev alginat, taninska kiselina, kitozan, kalcijev klorid, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, metanol, etanol, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), kalijev persulfat, octena kiselina, natrijev nitrit, aluminijski klorid, natrijev hidroksid, deionizirana voda

##### 3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor

Uređaji:

- Büchi inkapsulator (Büchi Encapsulator B-390, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)
- analitička vaga (Precisa 100A – 300M, Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Švicarska)
- HVED generator (IMP-SSPG-1200, IMPEL, Zagreb, Hrvatska)
- vorteks (Lab Dancer, IKA, Königswinter, Njemačka)
- spektrofotometar (Shimadzu UV-1900i, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)
- teksturometar (TA.HDPlus, Stable Micro Systems, Godalming, Velika Britanija)
- magnetska miješalica (MSH-300, BioSan SIA, Riga, Latvija)
- optički mikroskop (Leica MZ16a stereo-microscope, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Švicarska)
- magnetska miješalica (MM-540, Tehnica, Železniki, Slovenija)
- termostat (ED-5, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Njemačka)

Stakleno posuđe: čaše (50 mL, 100 mL, 600 mL), epruvete, menzure (100 mL, 500 mL), kivete, staklene boce (500 mL, 1000 mL), Petrijeva zdjelica, lijevci, stakleni štapić, kapaljka, predmetno stakalce



Ostali pribor: magneti, automatske pipete, plastične kivete (10 mL, 50 mL), pinceta, aluminijska folija, stalak za epruvete, termometar, špatula, plastične boce (1000 mL), filter papir, cjediljka

### 3.2. Metode rada

#### 3.2.1. Priprema ekstrakata

Kako bi se pripremio ekstrakt potrebno je izvagati 2 g osušenog origana te ga pomiješati sa 100 mL destilirane vode. Pripremljeni uzorak je podvrgnut ekstrakciji na HVED generatoru (slika 5). Nakon završenog procesa ekstrakt je profiltriran te spremljen u plastične boce. Ekstrakt origana se kasnije koristi za inkapsulaciju. U radu Nutrizio i sur. (2020) vršili su optimizaciju procesa te su dobiveni optimalni parametri koji su korišteni za izradu i ovog rada. Parametri ekstrakcije prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Parametri ekstrakcije origana uz pomoć HVED generatora.

<b>Vrijeme ekstrakcije</b>	<b>9 min</b>
<b>Plin</b>	<b>dušik (N<sub>2</sub>)</b>
<b>Razmak između elektroda</b>	<b>1,5 cm</b>
<b>Napon istosmjernje struje</b>	<b>25 kV</b>
<b>Frekvencija</b>	<b>100 Hz</b>
<b>Jakost struje</b>	<b>20 mA</b>
<b>Trajanje električnog pulsa</b>	<b>0,4 µsek</b>



Slika 5. HVED generator (Impel grupa, Zagreb, Hrvatska)

### 3.2.2. Inkapsulacija

U jedan dio prethodno pripremljenog ekstrakta origana dodan je natrijev alginat (1,5 %, m/v), dok je u drugi dio dodana kombinacija natrijevog alginata (1,5 %, m/v) i taninske kiseline (3,5 %, m/v). Paralelno je pripremljena i otopina kalcijevog klorida (4 %, m/v) pri čemu je kalcijev klorid otopljen u ekstraktu. Pripremljene otopine natrijevog alginata i mješavine natrijevog alginata i taninske kiseline su propuštene kroz inkapsulator (Büchi Encapsulator B-390, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska). Na slici 6 prikazan je inkapsulator. Svaka je od otopina kapala u otopinu kalcijevog klorida koja se nalazila u čaši na magnetskoj miješalici. Naime, alginat u prisutstvu dvovalentnih kalcijevih iona odnosno kationa formira mrežu gela pri čemu nastaju kapsule s omotačem od kalcijevog alginata. Na taj način dobivene su dvije vrste kapsula. Prva vrsta sadržavala je 1,5 % natrijevog alginata (A), a druga 1,5 % natrijevog alginata i 3,5 % taninske kiseline (AT). Veličina nastalih kapsula ovisi o veličini otvora mlaznice (Rijo i sur., 2014) Tijekom i nakon provedene inkapsulacije, kapsule je potrebno miješati na magnetskoj miješalici 30 min u otopini kalcijevog klorida kako bi kapsule očvrsnule (Najafi-Soulari i sur., 2016). Nakon 30 min obje vrste kapsula su podijeljene na pola dobivene količine te je jedna od polovica uronjena u otopinu kitozana te u njoj miješana na magnetskoj miješalici 60 min. Otopina kitozana pripremljena je dodavanjem kitozana (0,5 %, m/v) i octene kiseline (1 %, v/v) u ekstrakt. Na taj način dobivene su još dvije vrste kapsula. Kapsule koje su sadržavale 1,5 % natrijevog alginata te koje su u uronjene u kitozan (AK) te one koje su sadržavale 1,5 % natrijevog alginata, 3,5 % taninske kiseline te su također uronjene u kitozan (ATK). Svaka od ukupno četiri vrste kapsula je nakon miješanja profiltrirana, temeljito isprana deioniziranom vodom te spremljena u plastične kivete. Parametri inkapsulacije prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Parametri inkapsulacije.

<b>Parametri inkapsulacije</b>	<b>1,5 % alginat</b>	<b>1,5 % alginat + 3,5 % taninska kiselina</b>
<b>Tlak (mbar)</b>	<b>54</b>	<b>96</b>
<b>Frekvencija</b>	<b>40</b>	<b>40</b>
<b>Amplituda</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Otvor mlaznice (mm)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Plin N<sub>2</sub> (bar)</b>	<b>2</b>	<b>2</b>



Slika 6. Inkapsulator (Büchi Encapsulator B-390, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)

### 3.2.3. Otpuštanje polifenola iz kapsula

Izvagano je 5 g mokrih kapsula koje sadržavaju čisti alginat (A) te kapsula čistog alginata koje su uronjene u otopinu kitozana (AK). Također, izvagan je 1 g mokrih kapsula koje sadržavaju alginat i taninsku kiselinu (AT) te iste takve kapsule koje su uronjene u kitozan (ATK). Navedene mase stavljene su u 20 mL deionizirane vode te miješane na magnetskoj miješalici u periodu od 120 min. Uzeti su alikvoti od 100  $\mu$ L nakon 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 i 120 min. Isti postupak proveden je i u otopini klorovodične kiseline (pH=1,64) pri čemu je temperatura procesa održavana na 37 °C. Alikvoti su korišteni u metodi određivanja ukupnih polifenola te su opuštanja rađena u paralelama.

### 3.2.4. Metoda određivanja ukupnih polifenola

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu (F-C) reagensa s reducirajućim spojevima odnosno polifenolnim spojevima. F-C reagens je smjesa fosfomolibdenske kiseline te se pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju do volframovih i molibdenovih oksida koji daju plavu boju. U reakciji svi polifenolni spojevi izreagiraju te se spektrofotometrijski određuje intenzitet nastalog obojenja koji je proporcionalan udjelu polifenola u uzorku (Ainsworth i Gillespie, 2007).

Metoda započinje dodavanjem 0,1 mL otopine uzorka u 7,9 mL destilirane vode. Nakon toga je dodano 0,5 mL F-C reagensa razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2. Dodatkom 1,5 mL natrijevog karbonata (20 %, m/v) započinje reakcija te je otopina vorteksirana. Potrebno je izraditi i uzorak slijepe probe gdje je umjesto uzorka dodano otapalo u kojem se vršilo

otpuštanje, u kiselini ili vodi, u istoj količini, dok je za slijepu probu u čistom ekstraktu korištena voda. Reakcija se odvijala 2 h te je nakon toga mjerena apsorbancija uzoraka pri 765 nm. Baždarni dijagram izrađen je sa standardnim koncentracijama galne kiseline te pripadajućim apsorbancijama. Vrijednosti izmjerene apsorbancije uzorka uvrštene su u jednadžbu pravca iz baždarnog dijagrama te je iz tih podataka izračunata koncentracija ukupnih polifenola. Rezultati su za ekstrakt origana izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po litri ekstrakta (mg EGK/L) (Vinceković i sur., 2019), dok su rezultati otpuštanja izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu kapsula (mg EGK/g) (Nutrizio i sur., 2020). Sva mjerenja su rađena u duplikatima.

### 3.2.5. Metoda određivanja ukupnih flavonoida

Metoda određivanja ukupnih flavonoida temelji se na kolorimetrijskoj reakciji s aluminijevim kloridom. Aluminijev klorid tvori stabilne kisele komplekse s C-4 keto skupinom i C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona i flavanola (Chang i sur., 2002).

Postupak izvođenja metode uključuje 1 mL uzorka odnosno 1 mL vode za slijepu probu. U uzorak je zatim dodano 6,4 mL vode te 300  $\mu$ L otopine natrijeva nitrita (0,5 g/L). Takva smjesa ostavljena je stajati 5 min. Nakon toga je dodano 300  $\mu$ L otopine aluminijevog klorida (1 g/L) te je reakcija stajala 6 min. Zatim je dodano 2 mL 1M natrijevog hidroksida, vorteksirano i mjerena je apsorbancija na 360 nm. Izmjerene apsorbancije uvrštene su u baždarni dijagram pri čemu je dobiven podatak o ukupnim flavonodima izraženim kao mg ekvivalenti kvercetina po litri ekstrakta (mg EK/L) (Ivanova i sur., 2010).

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Ova se metoda temelji na oksidacijsko redukcijskoj reakciji iščezavanja boje plavo-zelenog radikala kationa 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa) dodatkom antioksidansa (Pisoschi i Negulescu, 2011).

Kako bi se odredila antioksidacijska aktivnost u uzorku potrebno je prvo pripremiti otopinu ABTS<sup>+</sup> radikala oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa sa 140 mM kalijevog persulfata. Konačna koncentracija otopine kalijevog persulfata treba iznositi 2,45 mM. S obzirom da je stehiometrijski odnos ABTS-a i kalijevog persulfata 2:1, neće doći do potpune oksidacije te je potrebno otopinu omotati aluminijskom folijom te ostaviti stajati preko noći na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina je razrijeđena 96 %-tnim etanolom do konačne koncentracije ABTS<sup>+</sup> radikala od 1 %. Zatim je u 4 mL pripremljene otopine ABTS<sup>+</sup> radikala dodan alikvot od 40  $\mu$ L uzorka, dok se za pripremu slijepe probe koristilo 40  $\mu$ L

destilirane vode. Otopine su vorteksirane te se reakcija odvijala u mraku tijekom 6 min. Nakon isteklog vremena mjerena je apsorbancija pri 734 nm. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija za poznate vrijednosti koncentracija Trolox-a, izrađen je baždarni pravac. Promjena apsorbancije ABTS radikala nakon reakcije računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe. Koristeći baždarni pravac preračunata je apsorbancija na koncentraciju Trolox-a te su rezultati izraženi kao mmol/L ekvivalenata Troloxa (mmol ET/L) (Huang i Prior, 2005; Pisoschi i Negulescu, 2011). Mjerenja su napravljena u duplikatima.

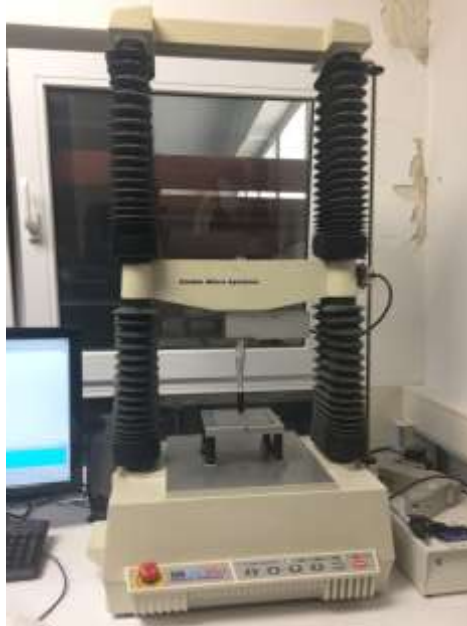
### 3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Metoda se temelji na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolu. DPPH radikal zbog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra. U prisutnosti antioksidansa, odnosno elektron donora, dolazi do stabilizacije DPPH radikala te do promjene iz ljubičaste boje u žutu (Pisoschi i Negulescu, 2011).

Za provođenje analize potrebno je pripremiti 0,094 mM otopine DPPH u metanolu. U 100  $\mu$ L uzorka, odnosno 100  $\mu$ L metanola za slijepu probu, dodano je 3,9 mL otopine DPPH te vorteksirano. Reakcija se odvijala u mraku tijekom 30 min. Nakon završetka reakcije mjerena je apsorbancija pri 515 nm te oduzeta od apsorbancije slijepe probe. Na osnovu izmjerene vrijednosti te baždarnog dijagrama ista se preračunala na koncentraciju Trolox-a. Rezultati su izraženi kao mmol/L ekvivalenata Trolox-a (mmol ET/L) (Vinceković i sur., 2019).

### 3.2.8. Analiza teksture kapsula

Mokrim je kapsulama određena maksimalna sila kompresije te izvršeni rad. Mjerenja su provedena u 10 paralela pomoću teksturometra (TA.HDPlus, Stable Micro Systems, Godalming, Velika Britanija). Ispitivanje je provedeno pomoću polimerne sonde SMS P/0-5R i ćelije opterećenja 5 kg na sobnoj temperaturi, dok je dubina prodiranja u uzorak iznosila 1 mm. Na slici 7 prikazan je teksturometar.



Slika 7. Teksturometar (TA.HDPlus, Stable Micro Systems, Godalming, Velika Britanija)

### 3.2.9. Mjerenje promjera kapsula

Mjerenje promjera mokrih kapsula izvršeno je pomoću optičkog mikroskopa (Leica MZ16a stereo-microscope, Leica Microsystems Ltd., Switzerland). Na predmetno stakalce stavljeno je 50 kapsula uz dodatak nekoliko kapi vode kako bi se spriječilo sušenje. Izmjeren im je promjer uz pomoć programa Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, verzije E\_LCmicro\_09Okt2009. (Jurić i sur., 2019a). Na temelju rezultata izražena je srednja vrijednost ( $\bar{x}$ ) /1/.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n} \quad /1/$$

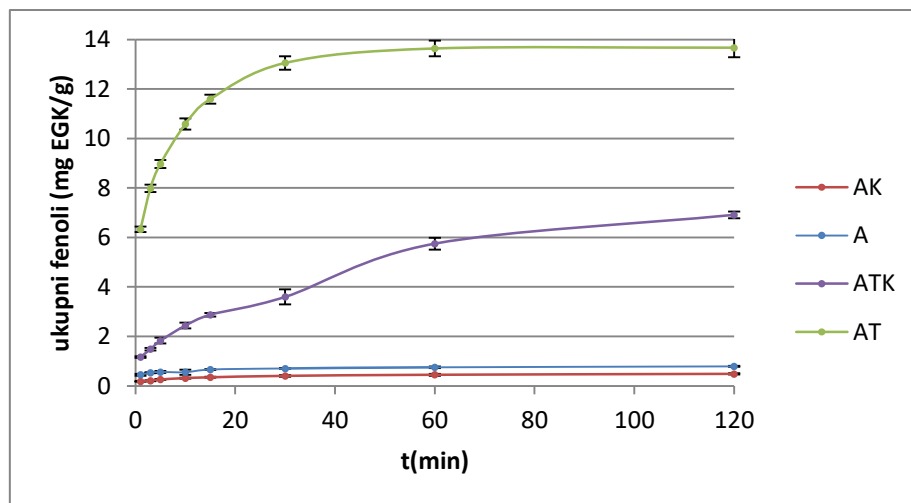
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati ovog rada obuhvaćali su otpuštanje polifenola iz četiriju vrsta kapsula u vodi i kiseline, određivanje ukupnih polifenola i flavonoida, određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom te određivanje fizikalnih parametara. Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Office Excel 2010.

Tablica 3. Rezultati mjerenja ukupnih polifenola te flavonoida te antioksidacijske aktivnosti ABTS i DPPH metodom u čistom ekstraktu origana.

<b>Ukupni polifenoli (mg EGK/L)</b>	<b>1453,33 ± 146,78</b>
<b>Ukupni flavonoidi (mg EK/L)</b>	<b>665,53 ± 7,47</b>
<b>Antioksidacijska aktivnost ABTS metodom (mmol ET/L)</b>	<b>7,89 ± 0,21</b>
<b>Antioksidacijska aktivnost DPPH metodom (mmol ET/L)</b>	<b>7,47 ± 0,03</b>

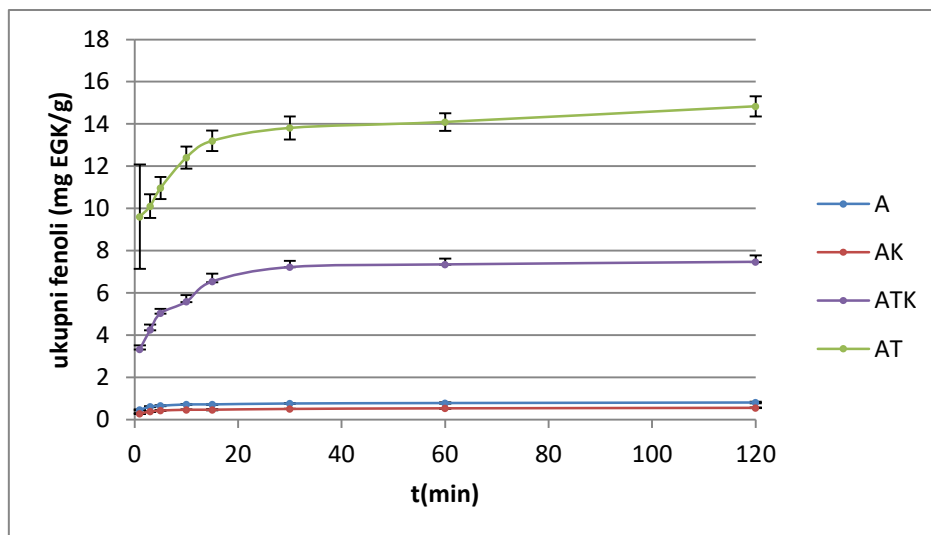
Količina ukupnih polifenola iznosi  $1453,33 \pm 146,78$  mg EGK/L. U radu su Nutrizio i sur. (2020) koristili istu tehniku te parametre ekstrakcije te se koncentracije polifenola podudaraju s pojedinim uzorcima. Koncentracija koja se najviše podudara s dobivenim rezultatom iznosi 1490,8 mg EGK/L ekstrakta. Količina ukupnih flavonoida iznosi  $665,53 \pm 7,47$  mg EK/L. Iz rezultata se može vidjeti kako dvije metode određivanja antioksidacijske aktivnosti pokazuju bliske rezultate.



Slika 8. Otpuštanje ukupnih polifenola iz četiriju vrsta mokrih kapsula u vodi

Na slici 8 prikazano je otpuštanje ukupnih polifenola iz mokrih kapsula u vodi. Otpuštanje se provodilo kroz 120 min. Vrijednosti koncentracija polifenola najviše su u kapsulama koje sadržavaju kombinaciju alginata i taninske kiseline (AT). Njihova prosječna koncentracija nakon 120 min iznosi  $13,669 \pm 0,389$  mg EGK/g kapsula. Takve rezultate pripisujemo taninskoj kiselini koja je i sama po sebi biljni polifenol čime pokazuje i veće koncentracije (Karagozlu i sur., 2021). Zatim slijede kapsule koje sadržavaju alginat i taninsku kiselinu te su naknadno uronjene u otopinu kitozana (ATK). Kapsule koje sadržavaju čisti alginat (A) te iste koje su uronjene u kitozan (AK) imaju puno niže koncentracije polifenola. Iz rezultata je vidljivo kako se dodatkom kitozana smanjuju koncentracije polifenola. To se može pripisati reakcijama između amino grupa kitozana i fenolnih grupa pri čemu nastaju vodikove i ionske veze što dovodi do zadržavanja polifenola u matriksu. Isto tako, dodatkom taninske kiseline dolazi do umrežavanja s kitozonom (eng. *cross-linking*) što usporava otpuštanje (Talón-Argente i sur., 2017). Također, kod kapsula koje sadržavaju taninsku kiselinu vidi se puno veći porast koncentracije polifenola nego kod ostalih kapsula. Koncentracija polifenola uglavnom stagnira odnosno stabilizira se nakon 60 min, iznimka su ATK kapsule gdje se pojavljuje lagani porast. U slučaju ATK kapsula prosječno povećanje koncentracije u razdoblju od 60 do 120 min iznosi 20,26 %. U slučaju AT kapsula ono iznosi 0,23 %, A kapsula 5 % te AK kapsula 8,24 %.





Slika 9. Otpuštanje ukupnih polifenola iz četiriju vrsta mokrih kapsula u kiselini

Na slici 9 prikazano je otpuštanje ukupnih polifenola iz mokrih kapsula u kiselini pri 37 °C te se time vršila simulacija uvjeta u želucu tijekom probave. Kapsule u kiselom mediju pokazuju slično ponašanje kao i u vodi. Međutim, zabilježene su veće prosječne koncentracije polifenola te brža stabilizacija krivulje. Nakon 30 min nisu zabilježena veća odstupanja osim u slučaju AT kapsula te je prosječna vrijednost tog odstupanja 5,27 %, dok sve ostale vrijednosti ne prelaze 5 %.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je brzina otpuštanja veća na početku reakcije u oba medija. To se može pripisati površinskim polifenolima koji su se najprije otpustili. Kombinacije s kitozonom u oba slučaja daju manje koncentracije polifenola. U radu Talón-Argente i sur. (2017) provode otpuštanje s kitozonom iz kapsula koje sadrže ekstrakt majčine dušice te kitozan pokazuje jednako ponašanje kao i u kapsulama koje sadrže ekstrakt origana.

Tablica 4. Rezultati mjerenja promjera mokrih kapsula

<b>VRSTA KAPSULA</b>	<b>PROMJER (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>A</b>	<b>2144, 71 <math>\pm</math> 23,48</b>
<b>AK</b>	<b>1991, 14 <math>\pm</math> 19,41</b>
<b>AT</b>	<b>2260, 43 <math>\pm</math> 18,37</b>
<b>ATK</b>	<b>2319,88 <math>\pm</math> 18,45</b>

Određivanjem promjera mokrih kapsula dobivaju se slični rezultati. Najveći prosječan promjer pokazale su ATK kapsule te on iznosi  $2319,88 \pm 18,45 \mu\text{m}$ , dok najmanji AK kapsule te on iznosi  $1991,14 \pm 19,41 \mu\text{m}$ . Oscilacije se mogu pripisati pogreškama prilikom izvođenja inkapsulacije. Promjer dobivenih kapsula u pravilu je dvostruko veći od otvora mlaznice. Jurić i sur. (2019b) su u radu koristili otvor mlaznice veličine  $300 \mu\text{m}$  pri čemu su također zabilježeni dvostruko veći promjeri dobivenih mokrih kapsula u odnosu na otvor mlaznice.

Tablica 5. Rezultati mjerenja sile kompresije i rada na mokrim kapsulama

<b>VRSTA KAPSULA</b>	<b>SILA (N)</b>	<b>RAD (mJ)</b>
<b>A</b>	<b><math>1,209 \pm 0,421</math></b>	<b><math>0,299 \pm 0,087</math></b>
<b>AK</b>	<b><math>1,195 \pm 0,442</math></b>	<b><math>0,289 \pm 0,084</math></b>
<b>AT</b>	<b><math>0,856 \pm 0,257</math></b>	<b><math>0,228 \pm 0,054</math></b>
<b>ATK</b>	<b><math>1,149 \pm 0,292</math></b>	<b><math>0,297 \pm 0,059</math></b>

Iz rezultata se može vidjeti kako je za kapsule koje sadrže taninsku kiselinu, alginat i kitozan, u odnosu na one koje sadrže samo taninsku kiselinu i alginat, potrebna veća sila i veći rad. Sila za ATK kapsule iznosi  $1,149 \pm 0,292 \text{ N}$ , dok radi iznosi  $0,297 \pm 0,059 \text{ mJ}$ . To bi se moglo pripisati kitozanu koji kao dodatan omotač daje čvrstoću kapsulama. Međutim, u slučaju kapsula koje sadržavaju alginat i alginat i kitozan, ne može se primijeniti isti zaključak. Prema tome se ne može tvrditi kako kitozan u ovom slučaju daje čvršće kapsule. Dakle najveća sila postignuta je za A kapsule te iznosi  $1,209 \pm 0,421 \text{ N}$ , a također i rad koji iznosi  $0,299 \pm 0,087 \text{ mJ}$ . U radu Belščak-Cvitanović i sur. (2015) navode kako sila kompresije za kapsule koje sadrže nešto veću koncentraciju alginata, točnije 2 %, iznosi  $2,11 \pm 0,07 \text{ N}$ . Prema tome su rezultati slični podacima iz literature.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Od ukupno četiri vrste kapsula najveću koncentraciju polifenola u oba medija, vodi i kiselini, pokazuju kapsule koje su sačinjene od alginata i taninske kiseline. Time takve kapsule dobivaju prednost pred ostalim kapsulama te bi se iste mogle ukomponirati u prehrambene proizvode.
- Također, prednost kapsula s taninskom kiselinom je i ta što je na istu količinu otapala potrebna manja masa kapsula što znači da se benefiti mogu ostvariti s malim količinama čime se postiže i ekonomičnost procesa.
- Uspoređujući otpuštanja kapsula u različitim medijima, nisu zamijećene znatne razlike. Ipak, kod kiseline su zabilježene nešto veće koncentracije polifenola te brža stabilizacija krivulje što znači da bi kapsule u potpunosti otpustile svoj sadržaj u želucu ukoliko bi bile ukomponirane u neki prehrambeni proizvod.
- Zbog povoljnog otpuštanja u vodi kapsule bi se mogle ukomponirati u proizvod koji se konzumira odmah nakon pripreme. Sama tekstura kapsula mogla bi biti nepoželjna potrošačima odnosno potrošači su skloniji homogenim proizvodima te ne preferiraju kapsule koje se nalaze direktno u hrani. Zato bi bilo poželjno maskirati kapsule u proizvodu, primjerice korištenjem filter vrećica u čaju gdje se na kraju dobije bistar proizvod.
- Značajne razlike u teksturi i veličini čestica, uspoređujući sve četiri vrste kapsula, nisu primijećene.

## 6. LITERATURA

Abd El Kader A. E., Abu Hashish H. M. (2020) Encapsulation Techniques of Food Bioproduct. *Egyptian Journal of Chemistry* **63(5)**: 1881 – 1909.

Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols* **2(4)**: 875-877.

Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **16(2)**: 295-315.

Anonymus 1. Priroda i biljke (godina nepoznata) <<https://www.plantea.com.hr/origano/>> (pristupljeno 15.5.2021.)

Arriola, N. D. A., de Medeiros, P. M., Prudencio, E. S., Müller, C. M. O., & Amboni, R. D. D. M. C. (2016) Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Bioscience* **13**: 32-40.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117(4)**: 426–436.

Azzouz, M. A., & Bullerman, L. B. (1982) Comparative Antimycotic Effects of Selected Herbs, Spices, Plant Components and Commercial Antifungal Agents. *Journal of Food Protection* **45(14)**: 1298–1301.

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.

Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie* **17(3)**: 197–203.

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis* **10(3)**: 178-182.

Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015) Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **71**: 57–168.

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences* **13(7)**: 8615–8627.

- De Monte, C., Carradori, S., Granese, A., Di Pierro, G. B., Leonardo, C., & De Nunzio, C. (2014) Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. *BMC Urology* **14(1)**: 1-11.
- Đurovic, R., & Đorđević, T. (2011) Modern Extraction Techniques for Pesticide Residues Determination in Plant and Soil Samples. *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis* : 221-247.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology* **21(10)**: 510–523.
- 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(9)**: 1107–1121.
- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., ... Režek Jambrak, A. (2018) Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International* **113**: 245–262.
- Gutiérrez-Grijalva, E., Picos-Salas, M., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. (2018) Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants* **7(2)**: 1-23.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(6)**: 1841–1856.
- Ivanova, V., Stefova, M., & Chinnici, F. (2010) Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *Journal of the Serbian Chemical Society* **75(1)**: 45-59.
- Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., Bedek, M., & Vinceković, M. (2019) Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agriculture* **18(11)**: 2534-2548.
- Jurić, S., Šegota, S., & Vinceković, M. (2019) Influence of surface morphology and structure of alginate microparticles on the bioactive agents release behavior. *Carbohydrate polymers* **218**: 234-242.
- Karagozlu, M., Ocak, B., & Özdestan-Ocak, Ö. (2021) Effect of Tannic Acid Concentration on the Physicochemical, Thermal, and Antioxidant Properties of Gelatin/Gum Arabic–Walled Microcapsules Containing *Origanum onites* L. Essential Oil. *Food and Bioprocess Technology* 1-13.
- Kintzios, S. E. (2012) Oregano. *Handbook of Herbs and Spices*: 417–436.

- Li, Z., Fan, Y., & Xi, J. (2019) Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chemistry* **277**: 246–260.
- Martens, S., & Mithöfer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66(20)**: 2399–2407.
- Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., & Kadivar, M. (2016) Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition* **27(16)**: 1631-1644.
- Nutrizio, M., Maltar-Strmečki, N., Chemat, F., Duić, B., & Jambrak, A. R. (2020) High-Voltage Electrical Discharges in Green Extractions of Bioactives from Oregano Leaves (*Origanum vulgare* L.) Using Water and Ethanol as Green Solvents Assessed by Theoretical and Experimental Procedures. *Food Engineering Reviews* : 1-14.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* **5(47)**: 1-15.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011) Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem* **1(1)**: 106.
- Rijo, P., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., & Reis, C. (2014) Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement* **58**: 249-255.
- Rocha, L. D., Monteiro, M. C., & Teodoro, A. J. (2012) Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acids -A Review. *Cancer and Clinical Oncology* **1(2)**: 109-121.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Latha, L. (2011) Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* **8(1)**: 1-10.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018) Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology* **78**: 34–60.
- Talón-Argente, E., Trifkovic, K.T., Vargas, M., Chiralt, A., González Martínez, M.C. (2017) Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. *Carbohydrate Polymers* **175**: 122-130.
- Vinceković M., Maslov Bandić L., Jurić S., Jalšenjak N., Čaić A., Živičnjak I., Đermić E., Karoglan M., Osrečak M., Topolovec-Pintarić S. (2019) The enhancement of bioactive potential in *Vitis vinifera* leaves by application of microspheres loaded with biological and chemical agents. *Journal of Plant Nutrition* **42(6)**: 543 – 558.
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019) Phenolic Compounds. Bioactive Compounds 33–50.

Yan, F., Azizi, A., Janke, S., Schwarz, M., Zeller, S., & Honermeier, B. (2016) Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. *Industrial Crops and Products* **92**: 19–25.

Zuidam, N. J., & Nedović, V. (Eds.). (2010) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Springer. str. 3-29.

Žuntar, I., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Nutrizio, M., Šupljika, F., Poljanec, A., ... Režek Jambrak, A. (2019) Phenolic and Antioxidant Analysis of Olive Leaves Extracts (*Olea europaea* L.) Obtained by High Voltage Electrical Discharges (HVED). *Foods* **8(7)**: 248.

## Izjava o izvornosti

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

Silvija Lea Švajček

ime i prezime studenta