

Potencijal različitih sustava nosača za inkapsulaciju polifenolnog ekstrakta lista maslačka (*Taraxacum officinale* L.) lonskim geliranjem

Habuš, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:184052>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

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



Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Matea Habuš

6484/PT

**POTENCIJAL RAZLIČITIH SUSTAVA NOSAČA
ZA INKAPSULACIJU POLIFENOLNOG
EKSTRAKTA LISTA MASLAČKA
(*Taraxacum officinale* L.) IONSKIM GELIRANJEM**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

POTENCIJAL RAZLIČITIH SUSTAVA NOSAČA ZA INKAPSULACIJU POLIFENOLNOG EKSTRAKTA LISTA MASLAČKA (*Taraxacum officinale* L.) IONSKIM GELIRANJEM

Matea Habuš, 6484/PT

Sažetak: Zbog niske bioraspoloživosti polifenolnih spojeva nakon oralne konzumacije, kao i njihove nestabilnosti tijekom različitih uvjeta proizvodnje, tehnika inkapsulacije posljednjih godina nametnula se kao učinkovita tehnika zaštite polifenolnih spojeva. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal različitih sustava nosača na bazi alginata za inkapsulaciju polifenolnog ekstrakta lista maslačka primjenom ionskog geliranja, uz variranje koncentracije gelirajućeg medija (2% i 3% CaCl_2). Kao nosač za imobilizaciju polifenola maslačka korišten je alginat i kombinacije istog s izolatima proteina sirutke (A-IPS) te kakaovim prahom (A-KP) i rogačem, kao novim, do sada ne korištenim materijalima za inkapsulaciju. Dobivenim hidrogel česticama ispitane su fizikalne i morfološke karakteristike, inkapsulacijska učinkovitost i kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

Pojačanje alginatnog gela kakaovim prahom i rogačem pokazalo je velik potencijal primjene takvih prirodnih sirovina u svrhu inkapsulacije polifenola. Veća koncentracija gelirajućeg medija (3% CaCl_2) rezultirala je smanjenjem veličine i mekšom teksturom čestica, dok je pravilniji, sferični oblik čestica postignut dodatkom 2% CaCl_2 . Najveću inkapsulacijsku učinkovitost hidroksicimetnih kiselina, kao dominantne skupine polifenola maslačka, imao je sustav A-IPS (95,55-95,81%), praćen sustavom A-KP (91,65-95,70%). Najbolji profil otpuštanja ukupnih polifenola iz čestica, kao i njihov najveći udjel, pokazao je sustav A-KP, gdje se 5,94 mg EGK/g čestica otpuštalo do 130 minute (3% CaCl_2) te 5,23 mg EGK/g čestica do 140 minute (2% CaCl_2).

Ključne riječi: alginat, ionsko geliranje, kakaov prah, maslačak, polifenoli

Rad sadrži: 46 stranica, 16 slika, 3 tablice, 63 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Arijana Bušić, mag. ing.

Rad predan: srpanj 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for technology of carbohydrates and confectionery products

THE POTENTIAL OF DIFFERENT DELIVERY SYSTEMS FOR ENCAPSULATION OF POLYPHENOLIC DANDELION LEAF (*Taraxacum officinale* L.) EXTRACT USING IONIC GELATION

Matea Habuš, 6484/PT

Abstract: Due to the low bioavailability of polyphenols after oral consumption, as well as their instability during different production conditions, recently encapsulation technique has established as an effective technique for polyphenolics entrapment. The aim of this study was to evaluate the potential of different alginate-based delivery systems for encapsulation of polyphenolic dandelion leaf extract using ionic gelation, and varying concentrations of gelling medium (2% and 3% CaCl₂). As a carrier for immobilization of dandelion polyphenols alginate and its combination with whey protein isolates (A-WPI), likewise cocoa powder (A-CP) and carob, as new uninvestigated carriers, was used. Obtained hydrogel particles were investigated for physical and morphological characteristics, encapsulating efficiency and release kinetics of polyphenols and antioxidant capacity in simulated gastrointestinal conditions. Reinforcement of alginate gel with cocoa powder and carob showed a great potential of usage such natural materials for polyphenolic encapsulation purposes. Higher concentration of gelling media (3% CaCl₂) resulted with a size reduction and softer texture of particles, while more regular, spherical particles were obtained by adding 2% CaCl₂. The highest encapsulation efficiency of hydroxycinnamic acid, as a dominant polyphenolic group of dandelion, revealed delivery system A-WPI (95.55-95.81%), followed by A-CP (91.65-95.70%). The best release profile of total polyphenols from particles, as well as their content, enabled system A-CP, where 5.94 mg GAE/g of particles was released up to 130 min (3% CaCl₂) and 5.23 mg GAE/g of particles up to 140 min (2% CaCl₂).

Keywords: alginate, cocoa powder, dandelion, ionic gelation, polyphenols

Thesis contains: 46 pages, 16 figures, 3 tables, 63 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: Arijana Bušić, BSc

Title Thesis delivered: July 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Maslačak (<i>Taraxacum officinale</i> L.)	3
2.1.1. Bioaktivni profil maslačka	3
2.1.2. Zdravstveni učinci bioaktivnih spojeva maslačka	4
2.2. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva	5
2.3. Inkapsulacija.....	6
2.3.1. Metode inkapsulacije.....	7
2.4. Morfologija i veličina mikročestica.....	7
2.5. Materijali za inkapsulaciju	9
2.5.1. Prirodni polimeri kao nosači za inkapsulaciju.....	9
2.6. Ionsko geliranje	11
2.7. Inkapsulacija polifenolnih spojeva	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijal	14
3.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta maslačka.....	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka	14
3.2.2. Karakterizacija čestica.....	16
3.2.2.1. Određivanje udjela vode.....	16
3.2.2.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika formuliranih čestica.....	17
3.2.2.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta.....	17
3.2.2.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	18
3.2.2.5. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica	18
3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola	19
3.2.4. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina	20
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	21
3.2.5.1. ABTS metoda	21
3.2.5.2. DPPH metoda	23
4. REZULTATI	25
4.1. Udjel vode u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka	26
4.2. Fizikalne i morfološke karakteristike formuliranih hidrogel čestica.....	26
4.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta.....	28
4.4. Kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka	30
4.5. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode.....	32
5. RASPRAVA	33
5.1. Udjel vode u hidrogel česticama	33
5.2. Fizikalne i morfološke karakteristike hidrogel čestica	33
5.3. Učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta	34
5.4. Kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	36
5.5. Povećanje mase čestica nakon vezanja vode.....	38
6. ZAKLJUČCI	39
7. LITERATURA	40

1. UVOD

Zahvaljujući raznolikim bioaktivnim svojstvima te povoljnim zdravstvenim učincima, polifenolni spojevi iz ljekovitih biljnih vrsta danas su postali jedan od najčešćih predmeta znanstvenih istraživanja. Upravo zato, posljednjih godina prehrambena, ali i druge industrije, poput farmaceutske i kozmetičke, sve se više okreću prirodnim sirovinama pa se pojedine biljne vrste često koriste u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda, lijekova i različitih kozmetičkih preparata (Sharma i Singh, 2010).

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je tradicionalna biljna vrsta bogatog bioaktivnog sastava, koji ipak još uvijek nije dovoljno istražen. Među polifenolnim spojevima maslačka dominiraju hidroksicimetne kiseline, a upravo se polifenolni spojevi smatraju odgovornima za visoku biološku aktivnost maslačka te njegovo antioksidacijsko, protuupalno i antitumorsko djelovanje (Sun i sur., 2014).

Ipak, sama učinkovitost polifenola u prevenciji i liječenju raznih simptoma bolesti ovisi o očuvanju njihove biorasploživosti. Polifenolne spojeve odlikuje niska biorasploživost, što se najčešće pripisuje njihovoj nestabilnosti i podložnosti metaboličkim procesima u cijelom probavnom sustavu, kao i visoka osjetljivost na vanjske okolišne uvjete, čime je otežana implementacija polifenola u prehrambene i druge proizvode (Bell, 2001). Stoga se posljednjih godina, tehnika inkapsulacija nametnula kao učinkovita tehnika zaštite polifenolnih spojeva, budući da omogućuje njihovu imobilizaciju ugradnjom u različite sustave nosača.

Inkapsulacija predstavlja tehniku obavijanja odnosno „pakiranja“ nekog aktivnog sastojka u drugi inertni sastojak, s ciljem očuvanja njegovih funkcionalnih svojstava (Đorđević i sur., 2014). Dobivene mikročestice otpuštaju inkapsulirani sadržaj kroz određeno vrijeme i pomoću različitih mehanizama, ovisno o ulozi inkapsuliranog sastojka u konačnom proizvodu. Inkapsulacija se često primjenjuje u području farmacije, prehrambene tehnologije, poljoprivrede, kozmetičke te tekstilne industrije (Dubey i sur., 2009). Materijali koji se koriste kao nosači za imobilizaciju čvrstih, tekućih ili plinovitih tvari su prirodni biopolimeri, a među njima najčešće natrijev alginat, zbog jednostavne primjene, biokompatibilnosti i niske cijene (Goh i sur., 2012). Najveći nedostatak formiranja alginatnih čestica je poroznost alginatnog gela zbog čega je otežano zadržavanje polifenolnih spojeva unutar takvog sustava pa se često alginat kombinira s drugim materijalima koji mogu kemijski vezati polifenolne spojeve i na

temelju mogućih interakcija povećati njihovu inkapsulacijsku učinkovitost (Yong Lee i Hong Yuk, 2007).

Podaci o inkapsulaciji polifenolnih spojeva maslačka su limitirani te je prema pretraženoj literaturi do sada inkapsuliran samo ekstrakt cvijeta maslačka ionskim geliranjem alginata i pektina u emulzijama (Belščak-Cvitanović i sur., 2016).

Stoga je cilj ovog rada imobilizacija polifenolnog ekstrakta lista maslačka primjenom različitih sustava nosača i ionskog geliranja kao postupka inkapsulacije. U svrhu formuliranja hidrogel čestica koristit će se alginat te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke, kakaovim prahom i rogačem te će se ispitati utjecaj koncentracije gelirajućeg medija na ispitivane parametre. Poseban naglasak stavit će se na ispitivanje potencijala kakaovog praha i rogača, kao novih sirovina koji do sada nisu korišteni u sustavu nosača za inkapsulaciju. Dobivenim česticama odredit će se udjel vode, fizikalni i morfološki parametri, inkapsulacijska učinkovitost te profil otpuštanja ukupnih polifenola, hidrokscimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim fluidima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Maslačak (*Taraxacum officinale* L.)

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je trajna zeljasta višegodišnja biljka iz porodice *Asteraceae*, koja raste i cvate od ranog proljeća do kasne jeseni. Cijela biljka je jestiva i ljekovita pa se često sakuplja s prirodnih staništa. Cvjetovi se upotrebljavaju za izradu meda, a korijen maslačka ima pozitivan učinak na peristaltiku crijeva. List maslačka se koristi u narodnoj medicini kao diuretik, snižava visok krvni tlak te pomaže kod prevencije anemije, zahvaljujući visokom udjelu željeza. Ukoliko su listovi maslačka ubrani u proljeće tada se koriste kao namirnica u prehrani (Erhatic i sur., 2014). U kombinaciji s drugim biljnim vrstama maslačak se koristi za liječenje hepatitisa te djeluje antikancerogeno i antireumatski (Ivanov, 2014). Čitava biljka maslačka sadrži holin, gorku tvar, zatim škrob, saponine, masti, tragove eteričnog ulja, šećer, visok udjel kalija, kalcija, mangana i natrija te vitamin C (Erhatic i sur., 2014).

2.1.1. Bioaktivni profil maslačka

Polifenolni spojevi maslačka pokazuju značajno antioksidacijsko, antikancerogeno, antimikrobno, antivirusno, protuupalno i hepatoprotektivno djelovanje u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima (González-Castejón i sur., 2012).

Udjel polifenolnih spojeva veći je u cvjetovima i listovima, odnosno vanjskim dijelovima biljke ($9,90 \pm 0,28$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka), u odnosu na korijen ($0,086 \pm 0,003$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka). Dominantni polifenolni spojevi maslačka su hidroksicimetne kiseline i njezini derivati, poput kafeinske kiseline, klorogenske kiseline i čikorinske kiseline, od kojih je čikorinska kiselina prisutna u najvećoj koncentraciji. Hidroksicimetne kiseline izdvajaju se uglavnom iz lišća i korijena maslačka (Williams i sur., 1995). Osim hidroksicimetnih kiselina, u cvijetu i lišću maslačka identificirani su i luteolin te luteolin-7-O-glukozid (Schutz i sur., 2005; Williams i sur., 1995).

Pregled bioaktivnog profila maslačka prema rezultatima različitih istraživanja naveden je u tablici 1.

Tablica 1. Bioaktivni profil cvijeta, listova i korijena maslačka

Bioaktivni spojevi maslačka	Dio biljke	Referenca
Hidroksicimetne kiseline (čikorinska, kafeinska, klorogenska kiselina), β-karoten	Cvijet	Belščak-Cvitanović i sur., 2016
Ukupni polifenoli, hidroskicimetne kiseline	Listovi	Ivanov, 2014
Čikorinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, hidroksibenzojeva kiselina, ferulinska kiselina, vanilinska kiselina, te kumarini umbeliferon, eskuletin i skopoletin	Korijen	Schütz i sur., 2006
Kvercetin, kvercetin 7-glukozid, luteolin 7-rutinozid	Cvijet i listovi	Wolbis i Krolikowska, 1985 Wolbis i sur., 1993
Skopoletin i eskuletin	Listovi	Komissarencio i Derkach, 1981
Apigenin-7-glukozid	Listovi	Hörhammer i Wagner, 1962
Luteolin, luteolin 7-glukozid, 2 luteolin 7-diglukozida	Cvijet i listovi	Williams i sur., 1995
Krisoeriol	Cvijet	Williams i sur., 1995
Kumarini cikorin i eksulin	Korijen	Williams i sur., 1995

2.1.2. Zdravstveni učinci bioaktivnih spojeva maslačka

Prema brojnim znanstvenim istraživanjima čikorinska kiselina i luteolin, kao dva glavna sastojka cvijeta maslačka imaju sposobnost reduciranja oksidativnog stresa, sposobnost smanjenja visoke koncentracije protuupalnih citokina, radikala dušikovog oksida u stanicama, faktora nekroze tumora (TNF)-α, te interleukina (IL)-1β (Park i sur., 2011). Luteolin i luteolin-O-glukozid sprječavaju ekspresiju proteina iNOS i COX-2, dva kritična enzima odgovorna za proizvodnju dušikovog oksida i PGE2 (Hu i sur., 2004; Harris i sur., 2006). Čikorinska kiselina djeluje inhibitorno na enzim integrazu koja je uključena u proces ulaska virusa humane imunodeficijencije, HIV-a u genom ljudskih stanica. Također, čikorinska kiselina inhibira navedeni enzim u koncentraciji od 1-4 μg/mL. Međutim, *in vitro*

istraživanja pokazala su da s vremenom HIV integraza postaje otporna na čikorinsku kiselinu (Lin i sur., 1999).

2.2. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva

Posljednih godina, polifenolni spojevi su zahvaljujući bogatom bioaktivnom profilu i visokoj biološkoj aktivnosti postali predmet ispitivanja brojnih znanstvenih istraživanja. Dosadašnja istraživanja sugeriraju da visok unos polifenolnih spojeva djeluje preventivno u razvoju različitih bolesti, posebice bolesti krvožilnog sustava, te im se pripisuje snažno antikancerogeno i antioksidativno djelovanje (Hu, 2011). Ipak, sama učinkovitost polifenola ovisi o očuvanju njihove bioraspoloživosti. Samo mali dio polifenolnih spojeva ostaje dostupan nakon oralne konzumacije, budući da uslijed razgradnje u probavnom sustavu ne stignu do ciljnih organa.

Općenito, bioraspoloživost predstavlja udjel hranjive tvari koji je probavljen, apsorbiran i metaboliziran uobičajenim putem. Bioraspoloživost svakog pojedinog polifenolnog spoja se razlikuje, a često koncentracija polifenola u hrani koja se konzumira ne odgovara njihovoj bioraspoloživosti u ljudskom organizmu (Pandey i Rizvi, 2009). Niska bioraspoloživost polifenolnih spojeva najčešće se pripisuje:

- nedovoljnom vremenu zadržavanja u želučanim uvjetima
- niskoj propusnosti i/ili topljivosti u crijevima
- nestabilnosti i podložnosti metaboličkim procesima u cijelom probavnom sustavu
- nestabilnosti na vanjske uvjete (Bell, 2011).

Dokaz apsorpcije polifenola u probavnom traktu jest porast antioksidacijskog kapaciteta plazme nakon konzumacije hrane bogate polifenolima (Scalbert i Williamson, 2000). Od polifenolnih spojeva, u organizmu se najbolje apsorbiraju izoflavoni i galna kiselina, zatim katehini i flavanoni, dok se najslabije apsorbiraju proantocijanidini i antocijani (Manach i sur., 2005). Većina polifenola u hrani se nalazi u obliku estera, glikozida ili polimera, koji se ne mogu apsorbirati u izvornom obliku, već ih je potrebno hidrolizirati crijevnim enzimima i prirodnom mikroflorom (Manach i sur., 2004). Također, polifenole često odlikuje trpak i gorak okus, koji je često potrebno maskirati prije implementacije u određeni proizvod.

Stoga se posljednjih godina, s ciljem povećanja bioraspoloživosti i očuvanja stabilnosti polifenolnih spojeva, kao i maskiranja njihovog nepoželjnog okusa, sve češće

primjenjuje tehnika inkapsulacije, koja predstavlja učinkovitu tehniku zaštite polifenola njihovom ugradnjom u zaštitne nosače.

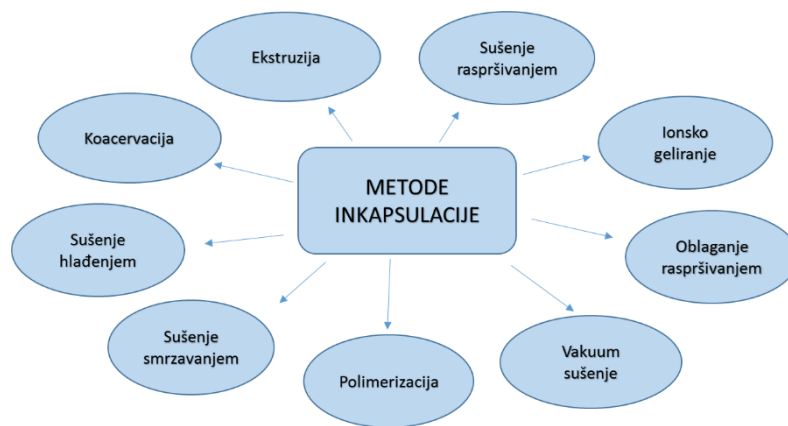
2.3. Inkapsulacija

Inkapsulacija se može definirati kao tehnologija pakiranja čvrstih, tekućih ili plinovitih tvari u male kapsule promjera od nekoliko nm do nekoliko mm čiji se sadržaj otpušta u kontroliranim dozama, kroz određeni vremenski period i pod određenim uvjetima (Nedovic i sur., 2011). Također, u većini slučajeva to je tehnologija u kojoj su aktivne komponente kompletno obavijene, prekrivene i zaštićene fizičkom barijerom, čime je onemogućena njihova protruzija, odnosno oštećenje ili izobličavanje (Đorđević i sur., 2014). Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, aktivno sredstvo, punjenje, unutarnja faza, dok tvar u koju se inkapsulira nazivamo premaz, membrana, ljuska, nosač, vanjska faza ili matriks.

Mnogi postupci inkapsulacije baziraju se na formiranju kapljica aktivnog sredstva u čvrstom, tekućem ili plinovitom stanju, koje se zatim okružuju nosačem u plinovitoj ili tekućoj fazi različitim fizikalno-kemijskim procesima (Zuidam i Shimoni, 2010). Praktički, svaki sastojak koji je potrebno zaštititi, izolirati i kontrolirano otpuštati moguće je inkapsulirati primjenom odgovarajućeg postupka i sustava nosača (Risch, 1995). Inkapsulacijom se omogućava stvaranje barijere između osjetljivih bioaktivnih materijala i njihovog okruženja, čime se postiže poboljšanje ili maskiranje lošeg okusa i mirisa tvari te povećana stabilnost hranjivih sastojaka, kao i njihova bioraspoloživost. Također, proces inkapsulacije najprije se počeo koristiti u području biotehnologije zbog povećanja efikasnosti procesa proizvodnje. Posljednjih godina, zahvaljujući povećanom interesu potrošača za različitim funkcionalnim proizvodima, prehrambena industrija sve veću pažnju poklanja inkapsulaciji aktivnih sastojaka. Time se aktivni sastojci štite od utjecaja vlage, topline i drugih ekstremnih uvjeta, čime se povećava njihova stabilnost u konačnom proizvodu, a time i raspoloživost. Stoga se, u prehrambenoj industriji inkapsulacija najčešće odnosi na implementaciju bioaktivnih molekula (antioksidansa, mineralnih tvari, vitamina, fitosterola, masnih kiselina) i živih stanica (probiotika) u različite prehrambene proizvode (Zuidam i Shimoni, 2010).

2.3.1. Metode inkapsulacije

Odabir metode inkapsulacije ovisi o tipu i fizikalnim svojstvima jezgre i nosača kapsule. Odabrana metoda inkapsulacije trebala bi rezultirati visokom inkapsulacijskom učinkovitošću, mogućnošću inkapsulacije većeg udjela aktivnog sredstva te odgovarajućom veličinom dobivenih čestica, poželjnih morfoloških karakteristika (bez repova ili udubina). Uz to, metoda mora biti prikladna za industrijsku proizvodnju (Vladisavljevic, 2012).



Slika 1. Metode inkapsulacije (Zuidam i Shimoni, 2010)

Većina metoda inkapsulacije bazira se na fizikalno-kemijskim procesima koji rezultiraju formiranjem željenih čestica. Budući da je aktivna tvar za inkapsulaciju najčešće u tekućem obliku, mnoge metode inkapsulacije baziraju se na sušenju (slika 1). Danas postoji veliki broj metoda inkapsulacije, no ne postoji jedinstven sistem njihove klasifikacije.

Prve i najčešće korištene metode inkapsulacije, koje već imaju i svoju industrijsku primjenu, a često se koriste za imobilizaciju bioaktivnih spojeva, su sušenje raspršivanjem, formiranje gel čestica ekstruzijom i emulgiranje. Od inovativnih metoda inkapsulacije koriste se kompleksna koacervacija, inkapsulacija u liposomima ili ciklodekstrinima, inkapsulacija bazirana na superkričnim fluidima te pomoću kvasaca (Đorđević i sur., 2015).

2.4. Morfologija i veličina mikročestica

Čestice dobivene mikroinkapsulacijom nazivaju se mikročestice, mikrokapsule ili mikrosfere, a razlikuju se u morfologiji i unutarnjoj strukturi. Dobivene mikročestice se

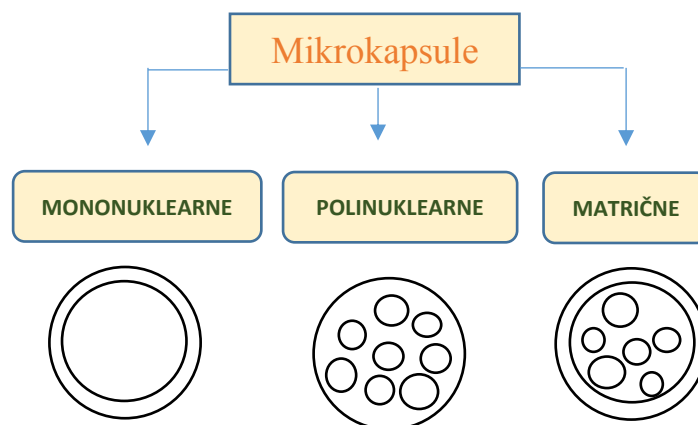
sastoje od jezgre koju čini kruta tvar, tekućina ili kapljica disperzije te omotača od polimernog materijala.

S obzirom na veličinu, čestice dobivene inkapsulacijom dijele se na (slika 2) :

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

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

- 1) MONONUKLEARNE mikročestice - sadrže omotač oko jezgre. (tzv. „akumulacijski tip“). Primjenom pritiska dolazi do pucanja kapsule i time oslobađanja njenog sadržaja.
- 2) POLINUKLEARNE čestice - imaju mnogo jezgri koje se nalaze unutar omotača, odnosno aktivno sredstvo je ovdje raspršeno homogeno ili u formi sitnih kapljica i to na površini nosača (tzv. „matrični tip“).
- 3) MATRIČNE čestice - tvar jezgre homogeno raspoređena u materijalu omotača, uz dodatni površinski sloj kao kod mononuklearnih mikročestica („matrični tip s omotačem“) (Jyothi Sri i sur., 2012).



Slika 2. Podjela čestica prema morfologiji (Ghosh, 2006)

2.5. Materijali za inkapsulaciju

Postoji velik broj materijala koji se mogu koristiti za inkapsulaciju čvrstih, tekućih ili plinovitih tvari. No, materijali za inkapsulaciju koji se koriste u prehrambenim proizvodima moraju biti probavljivi, biorazgradivi i prikladni za stvaranje barijere između unutarnje faze i njena okruženja, pa je tako njihov broj ograničen. Treba napomenuti da su propisi za prehrambene aditive stroži od onih u farmaciji i kozmetičkoj industriji. Većina materijala koja se koristi za inkapsulaciju u prehrambenom sektoru jesu biopolimeri, a najčešći, uz proteine i lipide, su polisaharidi - škrob i njegovi derivati, amiloza, amilopektin, dekstrin, maltodekstrin, sirupi i celuloza. Također, često se upotrebljavaju različiti hidrokoloide poput pektina, gume arabike i gume karaje, polisaharidi proizvedeni iz morskih algi, poput alginata, ili polisaharidi mikrobnog i životinjskog podrijetla (dekstran, kitozan ili gelan). Od proteina najčešće se koriste mliječni proteini, poput proteina sirutke, kazeina te gluten (Wandrey i sur., 2010).

Odabir odgovarajućeg materijala za inkapsulaciju određuje konačna fizikalna i kemijska svojstva formirane čestice. Nosač za inkapsulaciju mora biti sposoban stvoriti film koji je kohezivan s inkapsuliranom aktivnom tvari, kemijski joj odgovarati i biti inertan (Nedovic i sur., 2011) te mora imati odgovarajuću čvrstoću, stabilnost, fleksibilnost i nepropusnost (Umer i sur., 2011). Najvažniji kriteriji koje treba uzeti u obzir prilikom odabira prikladnog nosača za inkapsulaciju su funkcija samog inkapsuliranog sustava u konačnom proizvodu, koncentracija aktivne tvari, način otpuštanja i stabilnost sustava. U konačnici, preduvjet za stabilan konačan prehrambeni proizvod odredit će fizikalno-kemijske promjene samog materijala. Stoga je potrebno detaljno istražiti i analizirati svojstva materijala kako bi se unaprijed moglo predvidjeti njegovo ponašanje i utjecaj na hranu (Nedovic i sur., 2011).

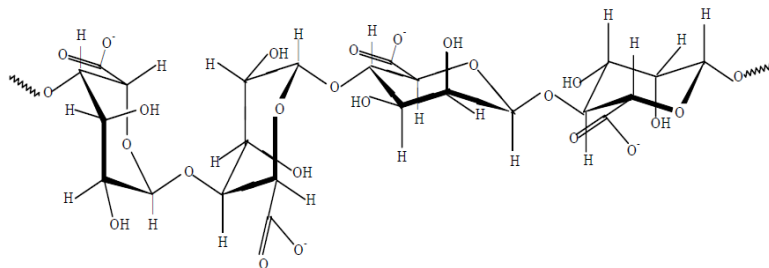
2.5.1. Prirodni polimeri kao nosači za inkapsulaciju

Upravo zbog poželjnih fizikalnih i kemijskih svojstava koji se mogu lako modificirati i mijenjati te biorazgradivosti i biokompatibilnosti, najčešće korišteni nosači za mikroinkapsulaciju bioaktivnih sastojaka su prirodni i polusintetski polimeri.

Hidrogelovi predstavljaju trodimenzionalnu mrežu hidrofilnih polimera koji sadrže veliku količinu vode. Oni su čvrsti, ali se na molekularnoj razini ponašaju kao otopine, a nastaju kemijskim ili fizikalnim povezivanjem samih polimera, o čemu ovise njihova

svojstva. Među sintetskim hidrogelovima poznati su polietilen oksid, poliakrilna kiselina, polivinil alkohol, te poli (N-izopropil-akrilamid), dok su od prirodnih hidrogelova najznačajniji alginat, kitozan, dekstran, hijaluronska kiselina, pektin, fibrin, kolagen i želatina.

Alginat je prirodni polimer ekstrahiran iz smeđih morskih algi. Zbog svoje zastupljenosti u prirodi, biokompatibilnosti, niske toksičnosti, niske cijene (Yong Lee i Hong Yuk, 2007), visoke poroznosti koja olakšava difuziju makromolekula te lake kontrole same poroznosti najčešće se koristi u prehrambenoj industriji kao zgušnjivač i sredstvo za emulgiranje (Gombotz i Fong Wee, 1998). Sadrži dvije uronske kiseline (slika 3), α - L-guluronsku kiselinu i β - D-manuronsku kiselinu, koje su povezane α - 1,4 - glikozidnom vezom (Racovića i sur., 2009). Njihova međusobna raspodjela i dužina sekvenci ovisi o vrsti tkiva iz kojeg je određen alginat izoliran (Yong Lee i Hong Yuk, 2007).



Slika 3. Struktura alginata (Racovića i sur., 2009)

Najvažnija značajka alginata je njegova sposobnost stvaranja gela u prisutnosti dvovalentnih i polivalentnih iona od kojih je najznačajniji kalcijev ion. Ti ioni stvaraju mostove između molekula alginata i na taj način grade trodimenzionalnu mrežu. Formiranje alginatnih čestica ovisi o brojnim čimbenicima kao što su naboj i veličina iona, pri čemu su alginatne mikročestice u prisutnosti jednovalentnih iona, fosfata i citrata te niskih pH uvjeta podložne kemijskoj razgradnji (Khosravi Zanjani i sur., 2014).

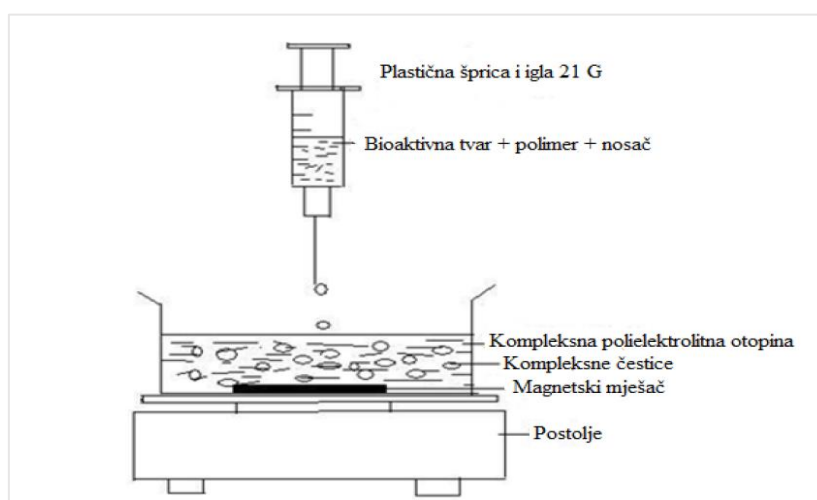
Alginat se, kao što je prethodno rečeno, može primijeniti u prehrambenoj industriji kao stabilizator i zgušnjivač, ali i u farmaceutskoj industriji kao ljepljivo sredstvo te u industriji papira, u proizvodnji boja i pasta za zube kao stabilizator, zgušnjivač, ljepljivo sredstvo ili punilo (Goh i sur., 2012).

Često se kao materijali za inkapsulaciju koriste i proteini soje, mliječni proteini (kazein i proteini sirutke) te proteini jaja, čija svojstva ovise o njihovoj građi aminokiselina i temperaturi denaturacije (Augustin i Hemar, 2008). Konkretno, proteini sirutke uključuju α -laktoalbumin, β -laktoglobulin, imunoglobuline, ali i velik broj manjih proteina. Oni su

globularni proteini, topljivi u prirodnom okruženju, mlijeku, neovisno o pH. No, pri temperaturi od 70°C dolazi do njihove denaturacije, pri čemu postaju netopljivi te tvore gelove različite kvalitete (Wandrey i sur., 2010). Skupljanje i geliranje proteina pogoduje stvaranju veza s inkapsuliranim sastojkom, a geliranje se pospješuje dodatkom iona u pregrijanu otopinu (Wandrey i sur., 2010), i to kalcija (Augustin i Hemar, 2008). Postoje različiti mehanizmi geliranja - izoelektrično taloženje, proteolitičko cijepanje, itd. (Livney, 2009), a najčešći princip geliranja je umreživanje karboksilnih grupa aminokiselina s kalcijem (Wandrey i sur., 2010). Također, proteini olakšavaju transport bioaktivnih komponenata zbog svojstva vezanja liganada (Augustin i Hemar, 2008).

2.6. Ionsko geliranje

Metoda ionskog geliranja je jedna od metoda pripreme nanočestica, odnosno mikročestica polisaharida koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju. U postupku ionskog geliranja polisaharidi (alginat, pektin ili gelan) se otapaju u vodi ili slabo kiselom mediju, nakon čega se takva otopina ukapava uz konstantno miješanje u drugu otopinu koja sadrži ione, i to najčešće katione suprotnog naboja (Racovića i sur., 2009). Zahvaljujući kompleksiranju između suprotno nabijenih vrsta, polisaharidi formiraju gel strukturu i talože se u obliku gel kuglica. Takve kuglice se izdvajaju filtracijom, ispiru vodom i suše (Racovića i sur., 2009). Faktori koji utječu na ionsko geliranje te veličinu i oblik čestica jesu temperatura, koncentracija polimera umreženih elektrolita, pH umrežene otopine (utječe još i na brzinu reakcije), koncentracija aktivnog sastojka te koncentracija nosača (Patil i sur., 2012).



Slika 4. Shematski prikaz pripreme čestica polisaharida metodom ionskog geliranja (Racovića i sur., 2009)

Primjerice, do formiranja kuglica alginata dolazi zbog reakcije guluronskih kiselina iz molekule alginata i metalnih iona iz otopine, uslijed čega se guluronske grupe slažu u karakteristične strukture, tzv. model „kutija za jaje (egg-box)“. Divalentni kation se veže na guluronske grupe i zajedno s njima čini jednu kooperativnu jedinicu veličine veće od 20 monomera. Svaki takav alginatni lanac može se vezati s puno drugih lanaca, pri čemu se formira gel struktura, a ne talog (Gombotz i Fong Wee, 1998).



Slika 5. Prikaz modela „kutija za jaje“ (A). Ionska interakcija između divalentnog kationa, Ca^{2+} i karboksilne grupe iz alginata (B) (Racovića i sur., 2009)

Kao otopine kationa najčešće se koriste otopine Ca^{2+} , Sr^{2+} ili Ba^{2+} , s tim da Sr^{2+} i Ba^{2+} tvore jači gel od Ca^{2+} . Metoda ionskog geliranja je blaga i jednostavna metoda. U konačnici, reverzibilno fizikalnim unakrsnim povezivanjem elektrostatskim interakcijama umjesto kemijskog povezivanja izbjegava se moguća toksičnost reagensa i druge neželjene posljedice (Racovića i sur., 2009).

2.7. Inkapsulacija polifenolnih spojeva

Posljednjih godina, u svrhu poboljšanja i prilagođavanja okusa, boje, teksture pa i stabilnosti proizvoda, u hranu se dodaju različiti funkcionalni sastojci. U tom kontekstu posebno su zanimljivi bioaktivni spojevi, poput polifenola, ali i probiotici zbog značajnog pozitivnog djelovanja na ljudsko zdravlje. No, kritičan parametar za njihovu uspješnu ugradnju u hranu jest sama stabilnost aktivnih komponenti. Primjerice, polifenolni spojevi osjetljivi su na kisik, vodu, svjetlost i toplinu, a nakon oralne konzumacije dolazi do njihove brze razgradnje uslijed djelovanja različitih metaboličkih procesa (Đorđević i sur., 2014). Dodatno negativno svojstvo je njihov neugodan, adstringentan okus (Fang i Bhandari, 2010).

Stoga se u svrhu zaštite aktivnih spojeva u probavnom traktu i s ciljem osiguranja kontroliranog otpuštanja u organizmu koristi tehnika inkapsulacije.

Među brojnim postupcima inkapsulacije, jedan od najčešće korištenih postupaka inkapsulacije bioaktivnih spojeva je ionsko geliranje (Đorđević i sur., 2014). Prema pretraženoj literaturi u tablici 2 nalazi se pregled pojedinih primjera inkapsulacije polifenolnih spojeva različitih biljnih vrsta primjenom ionskog geliranja i različitih sustava nosača.

Tablica 2. Mikroinkapsulacija polifenolnih spojeva metodom ionskog geliranja

Inkapsulirani polifenolni ekstrakti	Materijal za inkapsulaciju	Reference
Polifenoli cvijeta maslačka (<i>Taraxacum officinale</i>)	Alginat i pektin	Belščak-Cvitanović i sur., 2016
Polifenoli kakaovca	Alginat	Lupo i sur., 2014
Polifenoli hibiskusa (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Alginat	Bandera i sur., 2013
Polifenoli šipka (<i>Rosa canina</i>)	Alginat	Stoica i sur., 2013
Polifenoli ekstrakta Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	Alginat u kombinaciji s kitozanom	Anbinder i sur., 2011
Polifenoli ekstrakta Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	Kitozan	Harris i sur., 2011
Polifenoli majčine dušice (<i>Thymus serpyllum</i> L.)	Alginat	Stojanovic i sur., 2011

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

U ovom radu, za izdvajanje polifenolnih spojeva kao aktivnih sastojaka za inkapsulaciju, korišten je sušeni list maslačka (*Taraxacum officinale* L.) (berba 2014. godina), podrijetlom iz Koprivničko-križevačke županije. Uzorak je kupljen u specijaliziranoj trgovini za prodaju ljekovitog bilja, Suban d.o.o. te je usitnjen do praškastog oblika u električnom mlinu za kavu i prosijan do željene veličine čestica.

Kao nosač za inkapsulaciju korištena je natrijeva sol alginske kiseline iz smeđih algi, niske viskoznosti (Sigma-Aldrich Company Ltd. (Dorset, UK)). Od ostalih materijala za inkapsulaciju korišteni su izolati proteina sirutke (Davisco Foods International, La Suer, MN, SAD), kakaov prah (Zvečevo d.d., Požega, Hrvatska) te rogač (Šafram d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Rogač je za svrhe analiza dodatno usitnjen u električnom mlinu i prosijan.

3.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta maslačka

Ekstrakt maslačka pripremljen je prelijevanjem 20 g usitnjenog uzorka s 200 mL destilirane vode, temperature 80°C. Ekstrakcija je provedena pri konstantnoj temperaturi od 80°C uz stalno miješanje staklenim štapićem tijekom 30 minuta. Nakon ekstrakcije uzorak je procijeđen kroz metalno cjedilo s nekoliko slojeva gaze, nadopunjen do željenog volumena (200 mL) te ohlađen na sobnu temperaturu.

3.2. Metode

3.2.1. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka

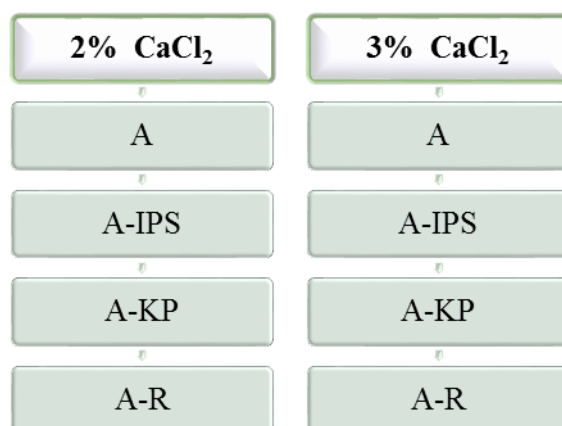
Za dobivanje sustava nosača na bazi alginata korištena je 3%-tna (w/v) otopina alginata niske viskoznosti. Pripremljena su četiri različita sustava, pri čemu se alginat kombinirao s proteinima, ali i s prirodnim sirovinama (kakaov prah i rogač), koje do sada nisu korištene kao sustavi nosača za inkapsulaciju.

Time su formulirani sljedeći sustavi:

- Čisti alginat: A (3%)
- Alginat + izolati proteina sirutke: A-IPS (80:20, w/w)
- Alginat + kakaov prah: A-KP (80:20, w/w)
- Alginat + rogač: A-R (80:20, w/w)

Sve otopine nosača pripravljene su otapanjem natrijeva alginata te izolata proteina sirutke, kakaovog praha ili rogača u prethodno pripremljenom ekstraktu maslačka (w/v), te su pomiješane u odgovarajućem masenom omjeru. Otopine sustava nosača otapane su na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi tijekom 24 h, nakon čega su korištene u daljnim analizama.

Za ionsko geliranje alginata u ovom istraživanju koristio se kalcijev klorid (CaCl_2). Pri tome su otopine gelirajućeg medija pripravljene otapanjem 2%-tnog i 3%-tnog kalcijevog klorida (w/v) u ekstraktu, čime je formulirano 8 različitih sustava nosača (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz formuliranih sustava nosača za inkapsulaciju polifenola maslačka

Za formiranje alginatnih hidrogel čestica korišten je postupak ukapavanja. 5 mL pripravljene otopine nosača u ekstraktu maslačka prebačeno je u plastičnu špricu od 10 mL i istiskivano kroz iglu od 27 G (0,4x13) u prethodno pripravljene otopine gelirajućeg medija. Tijekom postupka inkapsulacije, otopine gelirajućeg medija miješane su na magnetskoj miješalici, pri čemu su se formirale čestice sferičnog oblika. Nakon formiranja, čestice su miješane u otopini za geliranje dodatnih 30 min, nakon čega su izdvojene iz otopine kalcijevog klorida, isprane ekstraktom maslačka te spremljene u ekstrakt na +4 °C do analiza.

Također, kao kontrolne čestice napravljeni su prethodno opisani sustavi nosača na bazi alginata, koji su umjesto polifenolnog ekstrakta lista maslačka sadržavali destiliranu vodu.

3.2.2. Karakterizacija čestica

3.2.2.1. Određivanje udjela vode

Princip metode:

Ovim postupkom mjeri se masa suhe tvari nakon sušenja do konstantne mase budući da na temperaturi sušenja od 105°C dolazi do izdvajanja slobodne vlage iz uzorka. Udio suhe tvari izračunava se u odnosu na početnu masu uzorka koji se suši.

Postupak rada:

U prethodno osušene, ohlađene i izvagane aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom i poklopcem, odvažuje se 1 g hidrogel čestica ($\pm 0,0001$ g). Uzorak se u otklopljenim posudicama suši oko 3 sata pri 105°C u sušioniku s automatskim temperaturnim regulatorom. Kada je sušenje završeno, posudice se poklope u sušioniku i prenesu u eksikator, gdje se hlade na sobnoj temperaturi te ohlađene važu 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:

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

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

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.

3.2.2.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika formuliranih čestica

Veličina alginatnih 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 vrijenost 10 mjerenja.

Analiza teksture provedena je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija) opremljenom s 5 kg utegom. Analize su provedene na sobnoj temperaturi, na 3 različite čestice svakog sustava. Kako bi se postigao maksimalni omjer 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 Mirco Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za ispitivani parametar teksture (tvrdoća). Tvrdoća uzorka izražena je kroz maksimalnu silu (N) potrebnu za kompresiju uzorka.

Morfološke karakteristike, s ciljem određivanja oblika i strukture dobivenih hidrogel čestica, ispitane su snimanjem čestica mikroskopom uz odgovarajuće povećanje.

3.2.2.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

Udjel ukupnih polifenola i hidroksicimetnih 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 Vortex mikseru.

Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteau reagensa (opisano u poglavlju 3.2.3.), udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u reakciji s Arnou-im reagensom (opisano u poglavlju 3.2.4.), dok je određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode opisano u poglavljima 3.2.5.1. i 3.2.5.2. Postotak inkapsulacije polifenolnih spojeva i zadržanog antioksidacijskog kapaciteta izračunat je kao omjer udjela ukupnih polifenola ili hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih u početnim otopinama sustava nosača u ekstraktu maslačka korištenim za inkapsulaciju.

3.2.2.4. 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) uvjetima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom. Simulirane gastrična i intestinalna otopina pripravljene su prema protokolu europske farmakopeje (European Pharmacopeia 7.0, 2010), no, bez odgovarajućih 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). Formulirane čestice izdvoje se iz otopine za geliranje te se približno 0,6 g profiltriranih čestica suspendira u 30 mL SGF-a. Čestice u SGF-u konstatno su miješane na magnetskoj mješalici (podešenoj na 100 rpm), na temperaturi od 37°C. U određenim vremenskim razmacima iz otopine se izuzima 2 mL tekućeg medija do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 h te se nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama doda alikvot od 2 mL SGF-a. Čestice se zatim uklone iz otopine SGF-a filtriranjem i prenesu u 30 mL SIF-a (37°C) te konstantno miješaju na magnetskoj mješalici. Postupak uzorkovanja alikvota tekućeg medija u određenim vremenskim razmacima se ponavlja prema prethodno opisanom načinu. U ovako dobivenim alikvotima od 2 mL određuje se udjel ukupnih polifenola, hidrokscimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet, a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne ili kafeinske kiseline/g čestica ili mmol Trolox-a/g čestica. Pomoću dobivenih rezultata određuje se kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz ispitivanih sustava nosača.

3.2.2.5. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica

Omjer povećanja mase nastale usred vezanja vode (bubrenja) 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 i 6 sata) izmjerena je masa čestica. Čestice su vagane na analitičkoj vagi nakon što su uklonjene iz tekućeg medija, profiltrirane pomoću lijevka i filter papira te posušene staničevinom. Rezultati su prikazani kao omjer početne mase čestica i mase čestica nakon vezanja vode u određenom vremenskom periodu.

3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu 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-Ciocalteu 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).

Reagensi:

- 1) Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene epruvete
- 2) Mikropipeta volumena 100-1000 μL
- 3) Pipete volumena 5 mL i 10 mL
- 4) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) Spektrofotometar (Helios γ , ThermoSpectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu 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. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, 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. ApSORBANCIJU slijepa probe potrebno je oduzeti od apSORBANCIJE uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

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 ekvivalentima galne kiseline (EGK)/g čestica.

3.2.4. 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).

Reagensi:

- 1) Klorovodična kiselina (37%-tna), Kemika (Hrvatska)
- 2) Arnou reagens
 - 10%-tna vodena otopina natrijevog nitrita (Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)) i natrijevog molibdata (Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka))
- 3) Natrijev hidroksid (8,5 %-tna vodena otopina), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene epruvete
- 2) Odmjerne tikvice volumena 10-100 mL
- 3) Mikropipeta volumena 100-1000 μ L
- 4) Pipete volumena 0-10 mL

- 5) Analitička vaga
- 6) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 7) Spektrofotometar (Helios γ , ThermoSpectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

Za određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina, 500 μ L uzorka pomiješa se u epruveti sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnou-og reagensa, 1 mL 8,5 %-tne vodene otopine NaOH te se doda 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se zatim izmiješa te se apsorbancija odmah zatim očita na 490 nm (Matkowski i sur., 2008). Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu.

Udjel hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

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

gdje su:

x – udjel kafeinske kiseline (mg/L),

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard kafeinske kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), 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/g čestica.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.2.5.1. 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 apsorbanције 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 apsorbanције 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).

Reagensi:

- 1) Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- 2) 140 mM otopina kalijevog persulfata, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- 3) 7 mM otopina 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene epruvete
- 2) Pipeta volumena 10 mL
- 3) Mikropipeta volumena 100 μ L
- 4) Analitička vaga
- 5) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 6) Spektrofotometar (Helios γ , ThermoSpectronic, Velika Britanija)

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 izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzoraka potrebno je

izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 μL 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)

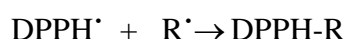
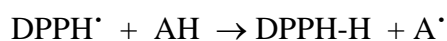
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

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 Troloxa/g čestica.

3.2.5.2. DPPH metoda

Princip metode:

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



Reagensi:

- 1) Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)

- 2) 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)

Aparatura i pribor:

- 1) Staklene epruvete
- 2) Pipeta volumena 10 mL
- 3) Mikropipeta volumena 100 μ L
- 4) Analitička vaga
- 5) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 6) Spektrofotometar (Helios γ , ThermoSpectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U tamnu epruvetu se otpipetira 100 μ L uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH 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 prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol 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.

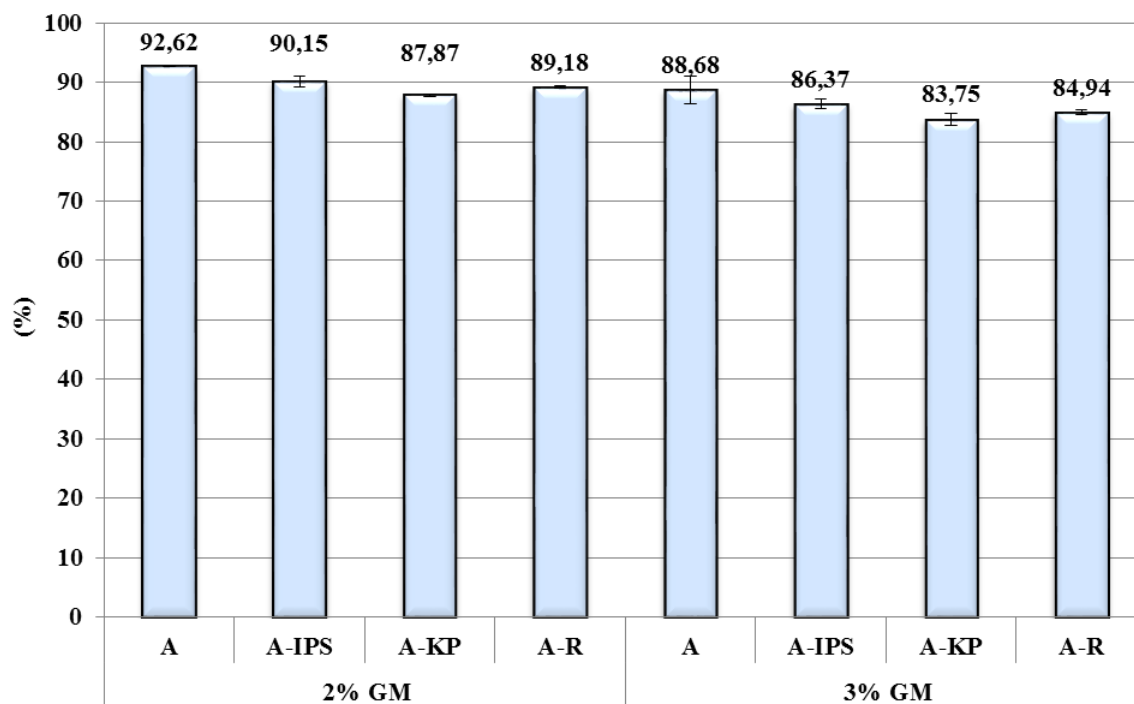
Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2),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

4. REZULTATI

U ovom radu ispitana je učinkovitost inkapsulacije polifenolnih spojeva ekstrakta maslačka postupkom ionskog geliranja, pri čemu se kao nosač koristio alginat te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke, kakaovim prahom i rogačem. Također, ispitan je i utjecaj koncentracije gelirajućeg medija (2%-tni i 3%-tni CaCl_2) na fizikalne i morfološke karakteristike dobivenih hidrogel čestica, stupanj inkapsulacije polifenolnih spojeva te zadržanog antioksidacijskog kapaciteta, kao i kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim fluidima. Dobiveni rezultati prikazuju udjel vode u formiranim hidrogel česticama (slika 7) te fizikalne (tablica 3) i morfološke (slike 8 i 9) karakteristike čestica. Učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola lista maslačka, primjenom različitih sustava nosača na bazi alginata i postupka ionskog geliranja, prikazana je na slici 10, hidroksicimetnih kiselina na slici 11, dok je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, primjenom ABTS i DPPH metoda, prikazana na slikama 12 i 13. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima prikazana je na slikama 14-17. Omjer povećanja mase liofiliziranih čestica nakon vezanja vode pomoću *Swelling* metode nalazi se u tablici 4.

Opis oznaka korištenih sustava nosača, koje se nalaze na grafovima, nalaze se u poglavlju 3.2.1., dok oznake 2 i 3 u zagradama odgovaraju koncentraciji gelirajućeg medija-GM (2%- i 3%-tni CaCl_2).

4.1. Udjel vode u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

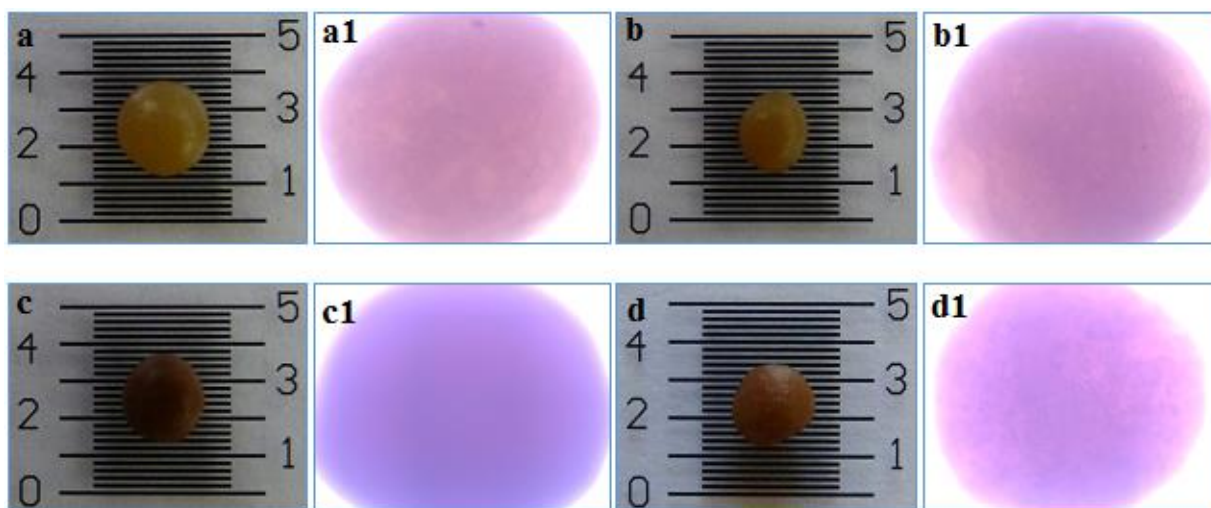


Slika 7. Udjel vode (%) u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

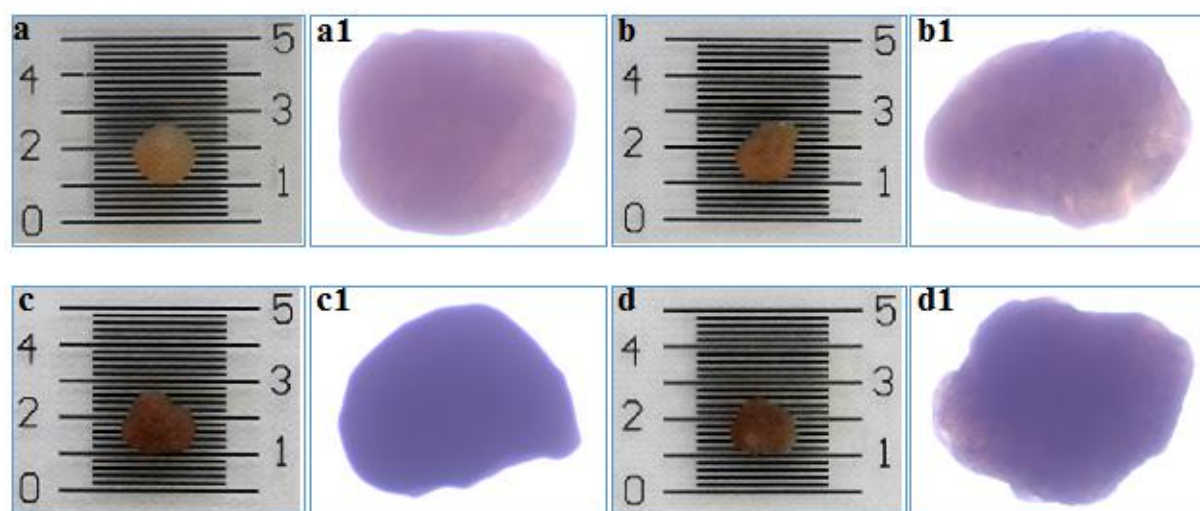
4.2. Fizikalne i morfološke karakteristike formuliranih hidrogel čestica

Tablica 3. Veličina i tvrdoća hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

2% GM	Veličina [mm]	Tvrdoća [N]
A	2,55 ± 0,07	1,04 ± 0,15
A-IPS	2,30 ± 0,14	1,64 ± 0,17
A-KP	2,45 ± 0,07	0,82 ± 0,09
A-R	2,23 ± 0,06	0,79 ± 0,08
3% GM	Veličina [mm]	Tvrdoća [N]
A	1,60 ± 0,08	0,18 ± 0,01
A-IPS	1,70 ± 0,10	0,31 ± 0,03
A-KP	1,80 ± 0,08	0,37 ± 0,07
A-R	1,57 ± 0,05	0,40 ± 0,05

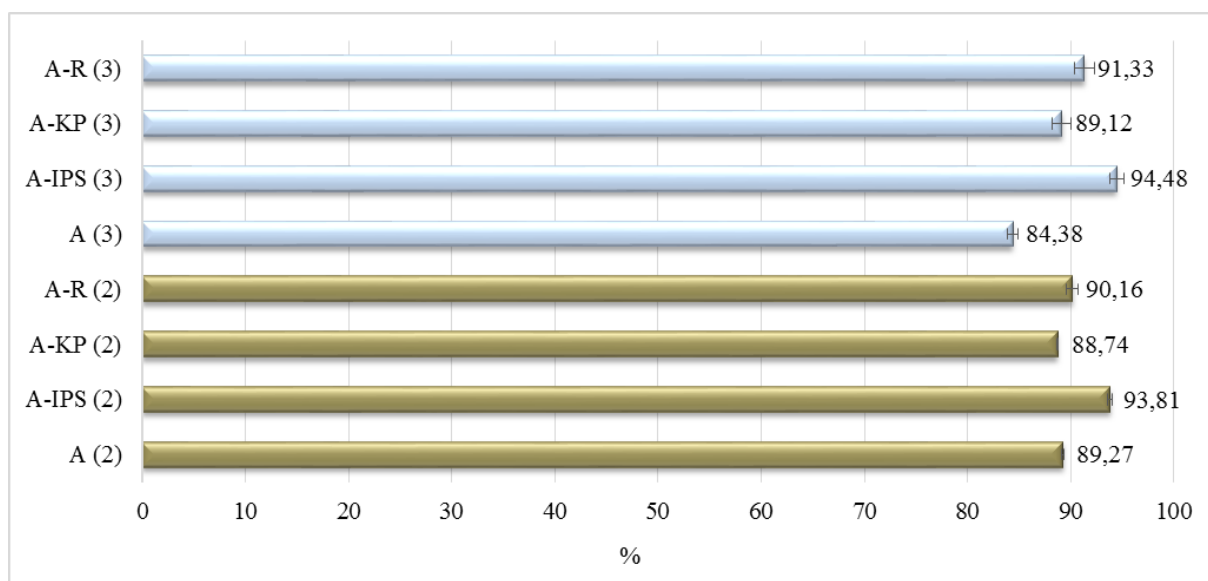


Slika 8. Fotografije formiranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka na kalibracijskoj pločici (a-d) s pripadajućim mikroskopskim slikama (a1-d1), pripremljene s 2%-tnim GM: a - alginat; b - alginat i izolati proteina sirutke; c - alginat i kakaov prah; d - alginat i rogač

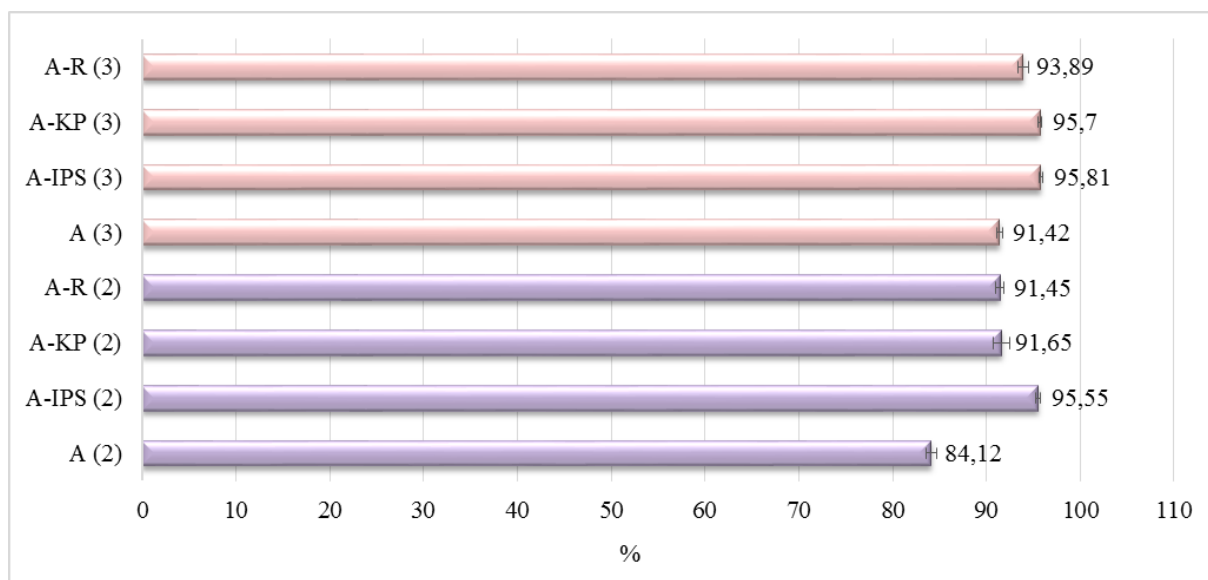


Slika 9. Fotografije formiranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka na kalibracijskoj pločici (a-d) s pripadajućim mikroskopskim slikama (a1-d1), pripremljene s 3%-tnim GM: a - alginat; b - alginat i izolati proteina sirutke; c - alginat i kakaov prah; d - alginat i rogač

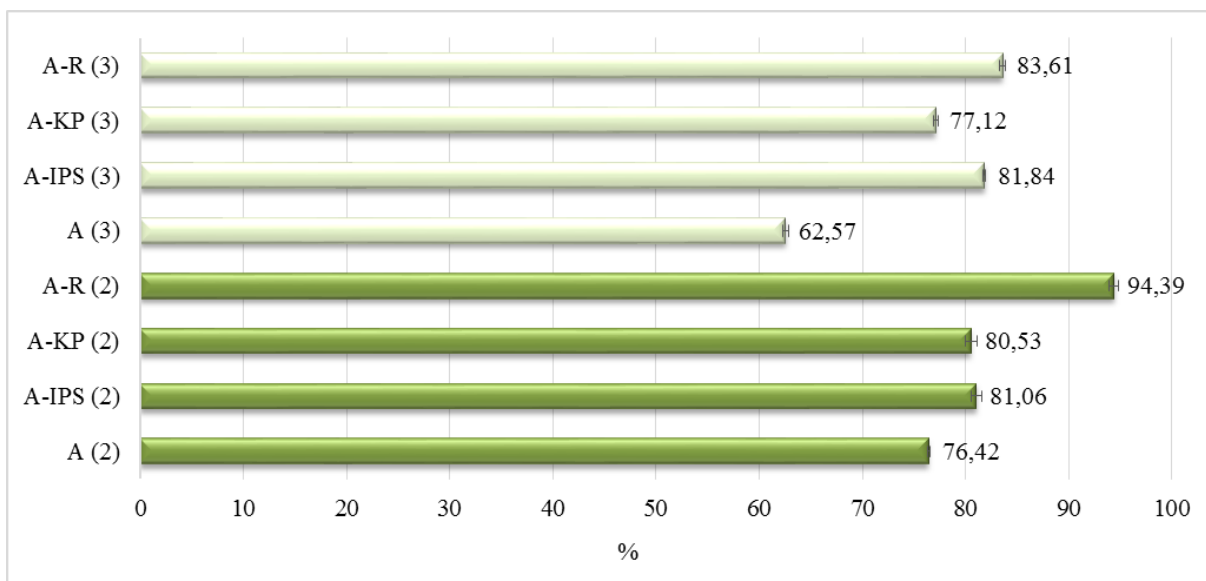
4.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta



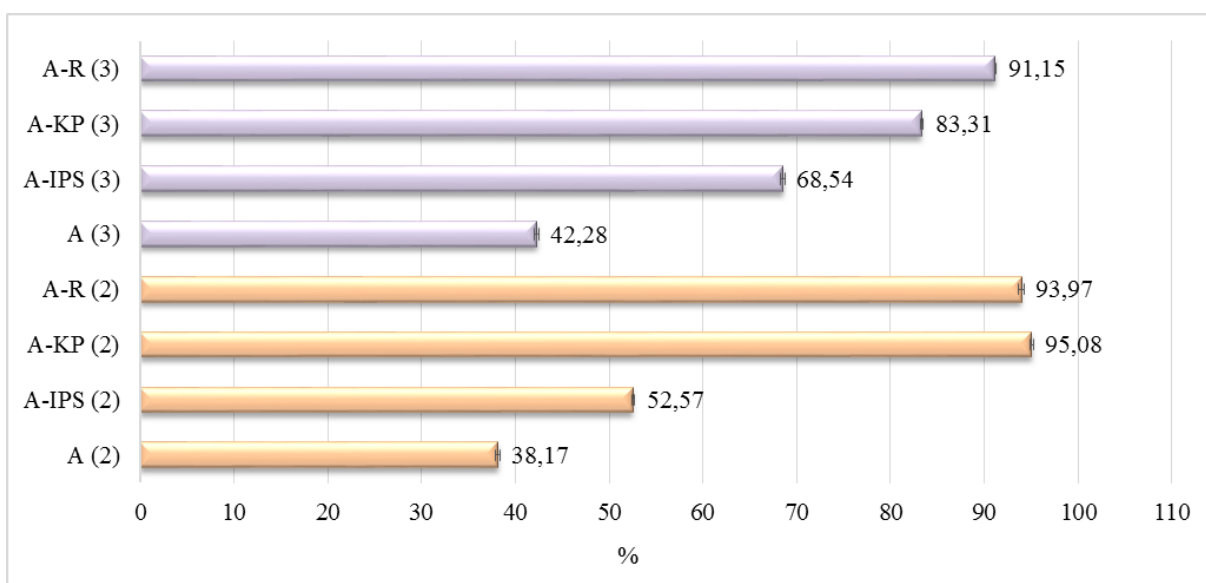
Slika 10. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka



Slika 11. Učinkovitost inkapsulacije (%) hidroksicimetnih kiselina u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

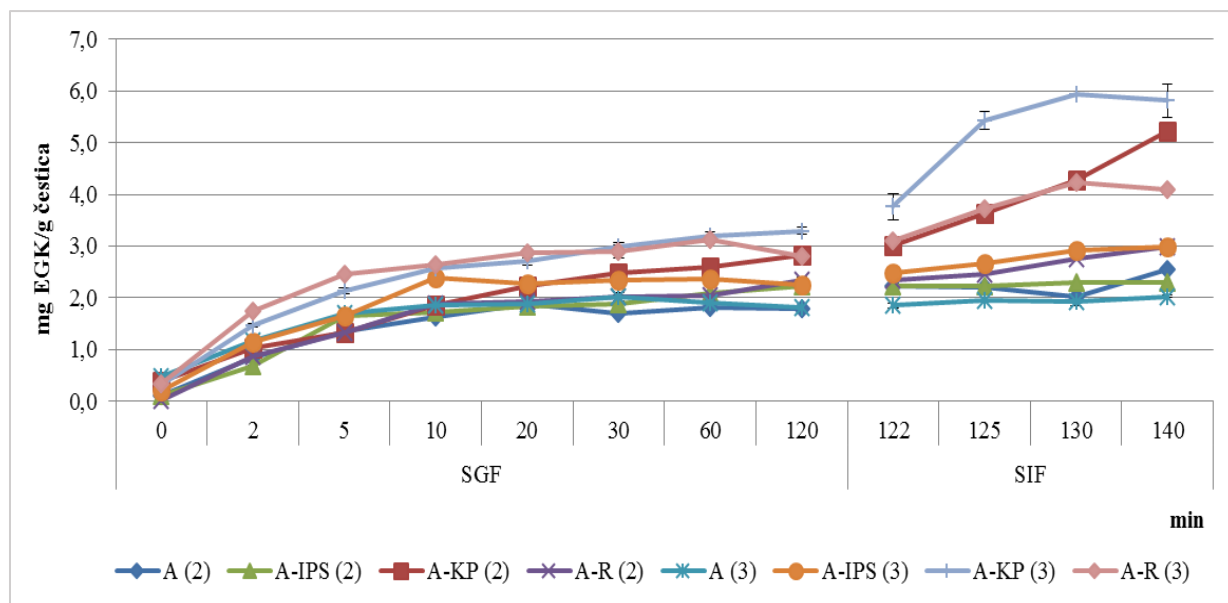


Slika 12. Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

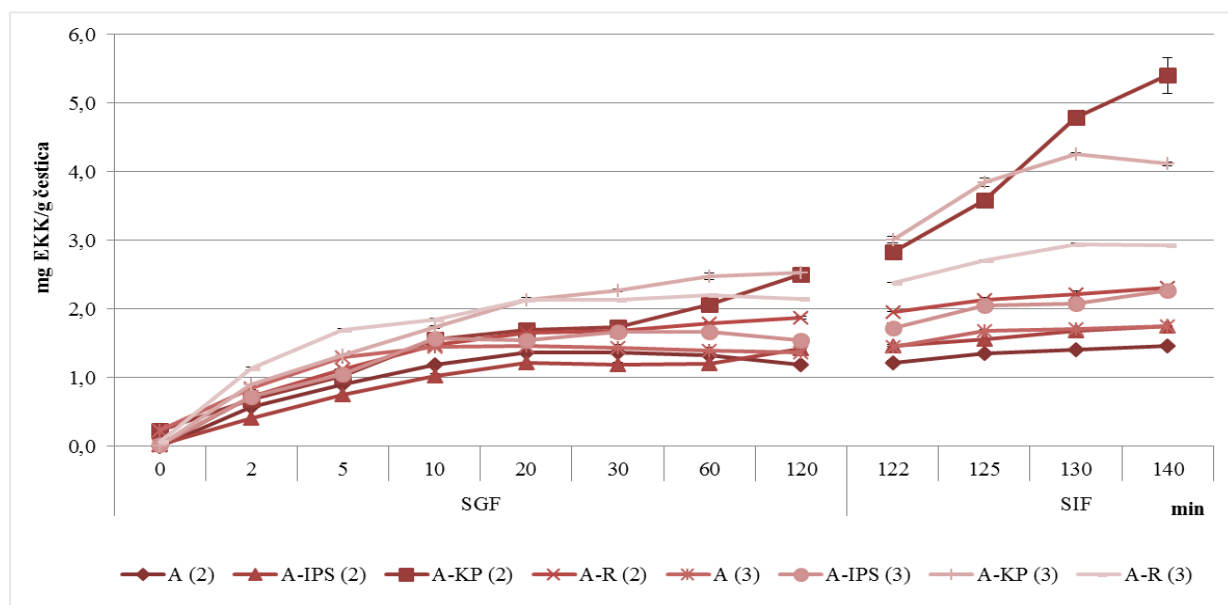


Slika 13. Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

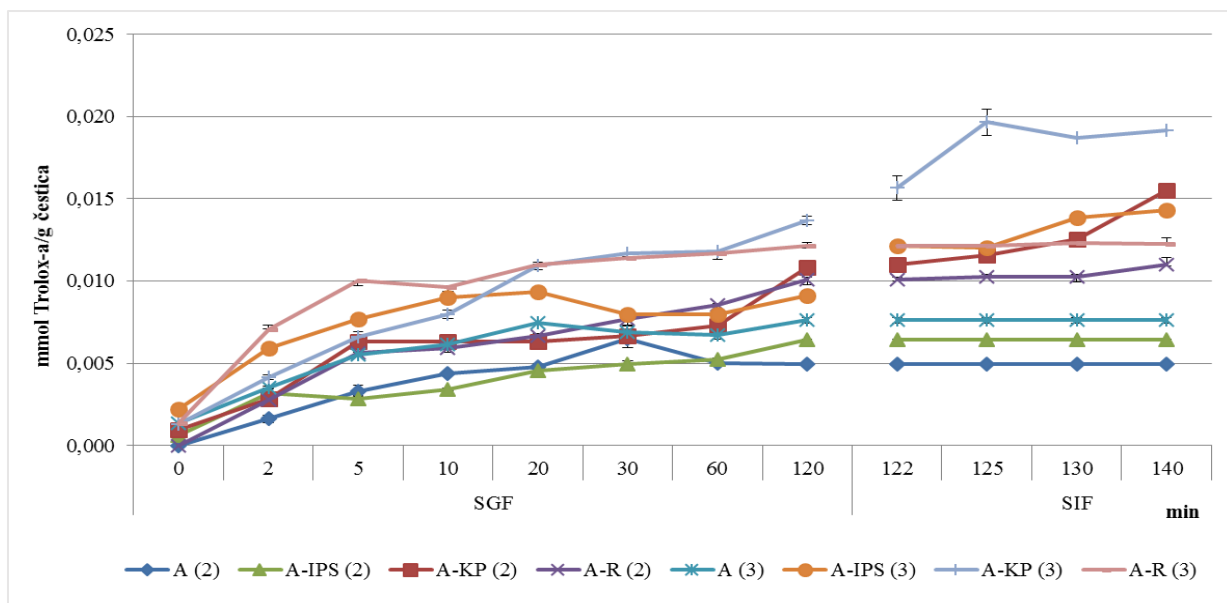
4.4. Kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka



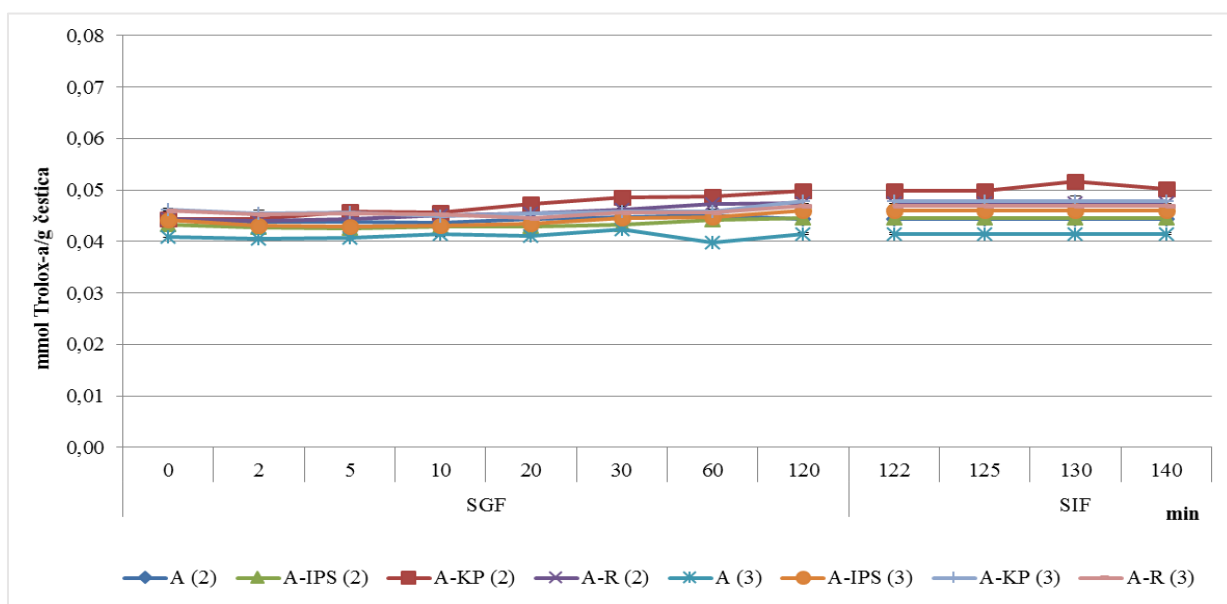
Slika 14. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola (mg EGK/g čestica) iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima



Slika 15. Kinetika otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (mg EKK/g čestica) iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima



Slika 16. Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) primjenom ABTS metode u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima



Slika 17. Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) primjenom DPPH metode u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima

4.5. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode

Tablica 4. Omjer povećanja mase nastale uslijed bubrenja (vezanja vode) u liofiliziranim česticama

2% GM	SR_{30min}	SR_{1h}	SR_{2h}	SR_{4h}	SR_{6h}	SR_{24h}
A	3,146 ± 0,008	3,866 ± 0,040	4,491 ± 0,012	5,470 ± 0,006	5,954 ± 0,013	5,868 ± 0,028
A-IPS	3,050 ± 0,012	3,534 ± 0,009	4,121 ± 0,023	4,898 ± 0,011	5,040 ± 0,018	4,923 ± 0,002
A-KP	2,658 ± 0,062	2,996 ± 0,134	3,298 ± 0,097	3,811 ± 0,091	3,922 ± 0,025	4,373 ± 0,034
A-R	2,880 ± 0,012	3,320 ± 0,035	3,793 ± 0,021	4,357 ± 0,041	4,526 ± 0,041	5,525 ± 0,050
3% GM	SR_{30min}	SR_{1h}	SR_{1h}	SR_{1h}	SR_{6h}	SR_{24h}
A	2,383 ± 0,018	2,558 ± 0,002	2,572 ± 0,016	2,644 ± 0,007	2,679 ± 0,013	2,885 ± 0,005
A-IPS	3,041 ± 0,012	3,084 ± 0,009	3,246 ± 0,018	3,136 ± 0,002	3,141 ± 0,005	3,420 ± 0,019
A-KP	2,816 ± 0,011	2,761 ± 0,064	2,883 ± 0,001	2,861 ± 0,186	2,899 ± 0,009	2,912 ± 0,005
A-R	3,270 ± 0,028	3,347 ± 0,064	3,310 ± 0,154	3,399 ± 0,018	3,559 ± 0,028	3,679 ± 0,024

*SR - Swelling ratio, omjer bubrenja mase

5. RASPRAVA

5.1. Udjel vode u hidrogel česticama

Na slici 7 prikazan je udjel vode u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka, kao rezultat omjera masa uzoraka prije i nakon sušenja. Na osnovu dobivenih rezultata vidljivo je da su najveći udjel vode, među svim ispitivanim česticama, sadržavale čiste alginatne čestice. Kod tih čestica upotreba 2%-tnog gelirajućeg medija (GM) rezultirala je većim udjelom vode (92,62%) u odnosu na sustav pripremljen s 3%-tnim GM (88,68%). U svim hidrogel česticama, dodatak izolata proteina sirutke, kakaovog praha i rogača u alginatni sustav rezultirao je smanjenjem udjela vode. Kod uzoraka pripremljenih s 2%-tnim GM udjel vode bio je sljedeći: (A) 92,62% > (A-IPS) 90,15% > (A-R) 89,18% > (A-KP) 87,87%. Sličan trend bio je vidljiv i kod čestica pripremljenih s 3%-tnim GM. Najmanji udjel vode među svim česticama sadržavale su alginatne čestice s kakaovim prahom i 3% kalcijevog klorida - 83,75%.

Dobiveni rezultati potvrdili su da dodatak drugih biopolimera kao nosača u gel mrežu alginata popunjava prostor između čestica i time smanjuje udjel vode u matriksu gela, što je potvrđeno i u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2016).

5.2. Fizikalne i morfološke karakteristike hidrogel čestica

U tablici 3 prikazan je utjecaj dodatnih nosača u alginatni matriks gela, kao i utjecaj koncentracije gelirajućeg medija, na parametre veličine i tvrdoće čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka. Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da je veća koncentracija kalcijevog klorida u gelirajućem mediju rezultirala manjom veličinom čestica. Sukladno tome, upotreba 2%-tnog GM dala je česticama veće veličine, gdje su najveći promjer imale čiste alginatne čestice (2,55 mm), koje su proporcionalno imale i najveći udjel vode među ispitivanim hidrogel česticama. „Jačanje“ alginatnog sustava, kod čestica pripremljenih s nižom koncentracijom kalcijevog klorida, rezultiralo je redukcijom veličine, gdje su najmanji promjer imale alginatne čestice s rogačem (2,23 mm).

Sustavi pripremljeni s 3%-tnim GM ne prate trend veličine čestica pripremljenih s 2%-tnim GM, iako je i ovdje najmanji promjer čestica imao alginat pojačan s rogačem (1,57 mm).

Nakon sustava A-R, vidljiv je sljedeći rastući niz veličine čestica : (A) 1,60 mm < (A-IPS) 1,70 mm < (A-KP) 1,80 mm.

U ovom istraživanju, čestice pripremljene s nižom koncentracijom CaCl_2 (2%) imale su veći udjel vode i veći promjer čestica te su rezultirale i većim vrijednostima tvrdoće, u rasponu od 0,79 N (A-R) do 1,64 N (A-IPS), kao što je prikazano u tablici 3. Dobiveni rezultati pokazali su da je dodatak IPS rezultirao stvaranjem dodatnog čvrstog omotača oko čestice. Manji utrošak sile za kompresiju čestica bilo je potrebno uložiti za čestice pripremljene s 3%-tnim GM, budući da su takve čestice imale mekšu teksturu (0,18 – 0,4 N). U ovom slučaju dodatak proteina i prirodnih sirovina u alginatni gel rezultirao je česticama veće tvrdoće, gdje su najčvršće čestice bile alginatne u kombinaciji s rogačem.

Prilikom promatranja morfoloških karakteristika, čestice pripremljene s 2%-tnim GM, koje su ujedno imale veću veličinu čestica, rezultirale su znatno pravilnijim izgledom čestica (slika 8), u odnosu na iste pripremljene s 3%-tnim GM (slika 9). Čiste alginatne hidrogel čestice, neovisno o koncentraciji GM, imale su znatno pravilniji i sferičniji izgled, u usporedbi s pojačanim sustavima alginata. Utjecaj dodatka omotača na izgled alginatnih čestica posebno je bio izražen kod čestica pripremljenih s većom koncentracijom GM, gdje su mikroskopske slike pokazale određena udubljenja na površini čestica, osobito u slučajevima gdje je alginat bio kombiniran s kakaovim prahom i rogačem (slika 9 - c1 i d1), što se potencijalno može pripisati nehomogenoj otopini nosača za inkapsulaciju. Također, i druga istraživanja su pokazala da se dodatak pomoćnih nosača prilikom ionskog geliranja alginata negativno odražava na morfologiju nastalih čestica, smanjujući zapravo njihovu sferičnost (Belščak-Cvitanović i sur., 2016; Al-Rousan i sur., 2007).

5.3. Učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

Na slici 10 prikazana je učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom lista maslačka, pripremljenih s različitim sustavima na bazi alginata, ionskim geliranjem. Slika 11 prikazuje učinkovitost inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina.

Svi formulirani sustavi pokazali su se kao jako učinkoviti sustavi za inkapsulaciju, s visokim stupnjem imobilizacije polifenolnih spojeva lista maslačka, gdje je nakon dodatka izolata proteina sirutke, kakaovog praha i rogača zamijećena povećana inkapsulacijska učinkovitost polifenolnih spojeva.

Kod sustava pripremljenih s 2%-tnim GM, najveću inkapsulacijsku učinkovitost polifenola imao je sustav A-IPS (93,81%), dok je alginatni sustav s kakaovim prahom pokazao najslabija svojstva zadržavanja ukupnih polifenola (88,74%), iako s visokim postotkom inkapsulacije (slika 10). Također, na slici 10 vidljivo je da je bolja inkapsulacija polifenola maslačka postignuta u slučaju formuliranja čestica s većom koncentracijom GM (3% CaCl₂), gdje je najbolji profil zadržavanja ukupnih polifenola pokazao također sustav A-IPS (94,48%), praćen sustavima A-R (91,33%) > A-KP (89,12%) > A (84,38%). Slični rezultati dobiveni su u radu Stoice i suradnika (2013), koji su također prilikom ionskog geliranja alginata i primjene veće koncentracije CaCl₂ (3%) ostvarili bolju inkapsulacijsku učinkovitost polifenola šipka (do 90%), u odnosu na korištenje 1%-tnog CaCl₂ kao gelirajućeg medija.

Povećana inkapsulacijska učinkovitost kafeina, nakon „jačanja“ alginatnog gela s pektinom i psilijumom, također je primjećena u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2014), što potvrđuje da je alginat učinkovitiji sustav zaštite aktivnih spojeva ukoliko se kombinira s drugim hidrokoloidima. Isto je dokazano u prijašnjim istraživanjima (Déat-Lainé i sur., 2012), gdje je veća inkapsulacijska učinkovitost, u ovom slučaju inzulina, postignuta pomoću alginatnih čestica s proteinima sirutke, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu. Nadalje, inkapsulacija polifenolnih spojeva ekstrakata ljekovitih biljnih vrsta (kopriava, glog, list maline i masline, stolisnik i dobričica), primjenom elektrostatske ekstruzije, bila je učinkovitija ukoliko se alginat kombinirao s kitozonom te je iznosila do 89% inkapsulacije (Belščak-Cvitanović i sur. 2011). U slučaju inkapsulacije ekstrakta lista maline, inkapsulacija polifenola pomoću sustava alginat-kitozan iznosila je do 80% (Belščak-Cvitanović i sur., 2010).

Na slici 11 primijećena je veća sposobnost zadržavanja hidroksicimetnih kiselina u formuliranim česticama, u odnosu na ukupne polifenole, što ukazuje na velik afinitet hidroksicimetnih kiselina prema polisaharidnim i proteinskim materijalima korištenima kao nosačima za inkapsulaciju. Ovakvi podaci također potvrđuju moguće kemijske interakcije između pojedinih hidroksicimetnih kiselina i polimernih nosača koji su omogućili njihovu bolju imobilizaciju u matriksu formiranih čestica (Belščak-Cvitanović i sur, 2016). Kao i kod inkapsulacije ukupnih polifenola, i ovdje je vidljiv veći stupanj imobilizacije primjenom veće koncentracije gelirajućeg medija, gdje je najveća učinkovitost inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina postignuta upotrebom alginata i izolata proteina sirutke (95,81%). „Jačanje“ alginata kakaovim prahom i rogačem također je rezultiralo izrazito visokim stupnjem zadržavanja hidroksicimetnih kiselina (95,70% i 93,89%), što pokazuje da je odabir ovih prirodnih

sirovina u sustavu nosača bio dobar i učinkovit izbor. Najmanji stupanj inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina imao je sustav s čistim alginatom i 2%-tnim GM (84,12%).

Također, prema dobivenim rezultatima primijećen je obrnuto proporcionalan odnos između veličine čestica i inkapsulacijske učinkovitosti polifenolnih spojeva, budući da su čestice manje veličine pokazale veći afinitet inkapsulacije polifenolnih spojeva.

Utjecaj koncentracije gelirajućeg medija na stupanj zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta pokazao je određene fluktuacije.

Na slici 12 prikazana je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode, gdje je u većini sustava veći antioksidacijski kapacitet postignut primjenom niže koncentracije CaCl_2 (2%). Stoga je najveći antioksidacijski kapacitet određen u česticama alginata s rogačem i 2%-tnim GM (94,39%). Najmanji stupanj zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS-a određen je u čistim alginatnim česticama (62,57% -3%-tni CaCl_2 i 76,42% - 2%-tni CaCl_2).

Također, primjenom DPPH metode učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u najmanjem udjelu određena je u čistim alginatnim česticama, dok je najveći antioksidacijski kapacitet postignut u alginatnim česticama s kakaovim prahom (2%-tni GM), s udjelom od 95,08% (slika 13).

5.4. Kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

Praćenje otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina praćeno je u simuliranom gastričnom (SGF) i intestinalnom fluidu (SIF) te prikazano na slikama 14 i 15.

Slika 14 prikazuje otpuštanje ukupnih polifenola iz formiranih čestica s imobiliziranim ekstraktom lista maslačka. Prilikom usporedbe čistih alginatnih čestica i alginatnih čestica s izolatima proteina sirutke, kakaovim prahom i rogačem, neovisno o koncentraciji GM, primijećeno je da je dodatak dodatnih omotača znatno usporio otpuštanje ukupnih polifenola iz formiranih čestica (uz iznimku čestica formiranih s IPS i 3%-tnim GM). U slučaju čistih alginatnih hidrogelova, difuzija polifenola odvijala se kontinuirano do 20 min (2%-tni GM) i 30 min (3%-tni GM) u SGF-u, uz daljne postizanje ravnotežnog stanja.

Dodatak rogača, a posebice kakaovog praha u alginatni matriks čestica omogućio je postepeno otpuštanje ukupnih polifenola do 130 i 140 minute te je njihov dodatak također povećao i koncentraciju ukupnih polifenola u dobivenim česticama. Najsporiji profil

otpuštanja ukupnih polifenola postignut je dodatkom kakaovog praha. Primjenom 3%-tnog CaCl_2 , ukupni polifenoli iz tih čestica kontinuirano su se otpuštali tijekom 130 min (5,94 mg EGK/g čestica) te i do 140 min, uz dodatak 2%-tnog CaCl_2 (5,23 mg EGK/g čestica).

Stoica i suradnici (2013) primjetili su da je tijekom inkapsulacije polifenola šipka metodom ionskog geliranja alginata s kitozonom, dodatak kitozana također usporio otpuštanje polifenolnog sadržaja u SGF- u i SIF- u te povećao njihovu koncentraciju.

Profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz formuliranih hidrogel čestica prikazan je na slici 15. U čistom alginatnom gelu, hidroksicimetne kiseline kontinuirano su se otpuštale do 20 min u gastričnim uvjetima te su se u intestinalnim uvjetima, u određenom vremenu, nastavile postepeno otpuštati. Među „pojačanim“ sustavima, dodatak izolata proteina sirutke rezultirao je najbržim otpuštanjem hidroksicimetnih kiselina, gdje su se kiseline iz čestica otpustile u SGF fluidu oko 20 i 30 minute, no, kao i alginatne čestice u intestinalnom fluidu ponovno su pokazale postepeno otpuštanje do 140 min. Opet, čestice obogaćene kakaovim prahom i rogačem pokazale su najbolji profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina, što je u skladu s rezultatima otpuštanja ukupnih polifenola. I u ovom slučaju, alginatne čestice u kombinaciji s kakaovim prahom pokazale su najsporiji mehanizam difuzije hidroksicimetnih kiselina u okolni medij te su omogućile njihovo otpuštanje do 130 i 140 minute. Također, čestice s kakaovim prahom imale su i najveći udjel hidroksicimetnih kiselina, u rasponu od 4,12 do 5,81 mg EKK/g čestica (ovisno o koncentraciji GM).

Poboljšani profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (klorogenske kiseline) iz „pojačanih“ alginatnih čestica, u ovom slučaju u kombinaciji s škrobom tapioke, zamjetili su i Lozano-Vasquez i suradnici (2015).

Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, primjenom ABTS i DPPH metode, nalazi se na slikama 16 i 17.

Kod ABTS metode najbolji profil otpuštanja, neovisno o koncentraciji gelirajućeg medija, karakterizira čestice alginata s kakaovim prahom, kao i najveći antioksidacijski kapacitet među ispitivanim hidrogelovima (slika 16). Kod ovih čestica antioksidacijski kapacitet se postepeno povećavao sve do 140 min (2%-tni GM), dok su čestice formulirane s višom koncentracijom GM otpuštale antioksidacijski kapacitet do 125 minute. Dobar profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta pokazale su i čestice formulirane s izolatima proteina sirutke, gdje je također zamijećeno postepeno otpuštanje u fluidima sve do 140 minute. Kod većine sustava pripremljenih s 2%-tnim GM primjećeno je ravnotežno stanje u intestinalnom fluidu, što ukazuje da se u tim sustavima sav antioksidacijski kapacitet primjenom ABTS metode otpustio u gastričnim uvjetima.

Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom odvija se vrlo brzo na početku u gastričnim uvjetima. Kod svih alginatnih sustava ravnotežno stanje, uz određene fluktuacije, zapaženo je tijekom svih 140 min (neovisno o koncentraciji GM). Kod čestica s kakaovim prahom primijećeno je neznatno povećanje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta do 130 minute (slika 17).

5.5. Povećanje mase čestica nakon vezanja vode

U tablici 4 prikazan je omjer povećanja masa liofiliziranih čestica uslijed bubrenja (vezanja vode), gdje je kod svih promatranih sustava vidljivo povećanje omjera masa tijekom vremena.

Prema analiziranim rezultatima vidljivo je da najveći omjer povećanja mase imaju čestice pripremljene s 2%-tnim gelirajućim medijem. Prema tome, najveći omjer povećanja mase vezanjem vode imale su liofilizirane čestice u sustavu čistog alginata i 2%-tnog GM, s omjerom od $5,868 \pm 0,028$ nakon 24 sata. Manji omjer povećanja mase imao je sustav alginata u kombinaciji s rogačem ($5,525 \pm 0,050$), zatim alginat s proteinima sirutke ($4,923 \pm 0,002$) i u konačnici alginat s kakaovim prahom ($4,373 \pm 0,034$).

Kod alginatnih čestica s 3%-tnim GM, najveći omjer povećanja masa pokazao je sustav alginata s rogačem ($3,679 \pm 0,024$), dok su najmanje povećanje masa nakon 24 sata imale čestice s čistim alginatom ($2,885 \pm 0,005$).

6. ZAKLJUČCI

1. Dodatak veće koncentracije kalcijevog klorida (3 %) rezultirao je smanjenjem veličine čestica inkapsuliranih polifenola maslačka i njihovom mekšom teksturom, ali i nepravilnijim oblikom čestica.
2. „Jačanje“ alginatnog gela s izolatima proteina sirutke, kakaovim prahom i rogačem rezultiralo je većim stupnjem inkapsulacije polifenolnih spojeva i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta te sporijim otpuštanjem polifenola.
3. Veća koncentracija gelirajućeg medija (3%-tni CaCl_2) rezultirala je boljom učinkovitošću inkapsulacije polifenolnih spojeva, pri čemu je sustav alginata s izolatima proteina sirutke pokazao najveći stupanj inkapsulacije ukupnih polifenola (94,48%), kao i hidroksicimetnih kiselina (95,81%).
4. Utjecaj koncentracije gelirajućeg medija na stupanj zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta pokazao je određene fluktuacije, pri čemu je najveći stupanj zadržavanja istog određen primjenom ABTS metode imao sustav alginata s rogačem (94,39%). Dodatak kakaovog praha u alginatni sustav pokazao je najveću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta prilikom određivanja DPPH metodom.
5. Alginatne čestice u kombinaciji s kakaovim prahom imale su najsporiji profil otpuštanja polifenolnih spojeva te su omogućile njihovo otpuštanje do 130 i 140 minute u simuliranom gastrointestinalnom fluidu.
6. Prirodne sirovine, kakaov prah i rogač, kao do sada nekorišteni materijali za inkapsulaciju, pokazali su izrazito velik potencijal za inkapsulaciju polifenolnih spojeva, a svojim sastavom dodatno su obogatili polifenolni sastav dobivenih čestica.

7. LITERATURA

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. *J. Encaps. Adsorp. Sci.* **1**, 1-8.

Augustin, M.A., Hemar, Y. (2008) Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 902-912.

Bandera, D., Villanueva-Carvajal, A., Dublán-García, O., Quintero-Salazar B., Dominguez-Lopez, A. (2013) Release kinetics of antioxidant compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. encapsulated in gelatin beads and coated with sodium alginate. *Int. J. Food Sci. Techn.* **48**, 2150-2158.

Bell, L.N. (2001) Stability testing of nutraceuticals and functional foods. U: Handbook of nutraceuticals and functional foods, (Wildman, R.E.C., ured.), 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. (2014) Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. *Food Chem.* **167**, 378-386.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Dujmić, F., Horžić, D., Manojlović, V., Komes, D. (2010) Encapsulation of polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves extract by electrostatic extrusion. U: Book of Full Papers of the 5th Central European Congress on Food, str. 8-14.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović-Cindrić, I., Nedvoić, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094-1101.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Chen, L., Subirade, M. (2006) Alginate whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials* **27**, 4646-4654.
- Déat-Lainé, E., Hoffart, V., Garrat, G., Beyssac, E. (2013) Whey protein and alginate hydrogel microparticles for insulin intestinal absorption: evaluation of permeability enhancement properties on Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.* **453**, 336-342.
- Dubey, R., Shami, T.C., Bhasker Rao, K.U. (2009) Microencapsulation technology and applications. *Defence Sci. J.* **59**, 82-95.
- 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. Eng. Rev.* **7**, str. 452-490.
- Erhatic, R., Vukobratović, M., Dudaš, S., Mužić, M. (2014) Kemijske karakteristike populacija maslačka s Križevačkog i Riječkog područja. *Agronomski glasnik* **76**, 127-136.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols-a review. *Food Sci. Techn.* **21**, 510-523.
- Ghosh, S.K. (2006) Functional coatings and microencapsulation: A general perspective. U: Functional coatings: by polymer microencapsulation, (Ghosh, S.K., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 1-28.
- Goh, C.H., Heng, P.W.S., Chan, L.W. (2012) Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic Applications. *Carbohydr. Polym.* **88**, 1-12.
- Gombotz, W.R., Wee, S.F. (1998) Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **31**, 267-285.
- González-Castejón, M., Visioli, F., Rodriguez-Casado, A. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Int. Life Sci. Inst.* **70**, 534-547.

Harris, G.K., Qian, Y., Leonard, S.S., Sbarra, D.C., Shi, X. (2006) Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E₂ formation in RAW 264.7 cells. *J. Nutr.* **136**, 1517-1521.

Harris, R., Lecumberri, E., Aparicio, I.M. (2011) Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr. Polym.* **84**, 803-806.

Hörhammer, L., Wagner, H. (1962) U: Chemistry of Natural and Synthetic Colouring Matters (Gore, T.S., Joshi, B.S., Sunthankar, S.V. And Tilak, B.D., ured.), Academic Press, New York, str. 315.

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

Hu, M.L. (2011) Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: More questions than answers. *Chang Gung Med. J.* **34**, 449-459.

Ivanov, I.G. (2014) Polyphenols Content and Antioxidant Activities of *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (Dandelion) Leaves. *Int. J. Pharmacogn. Phyt. Res.* **6**, 889-893.

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

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

Komissarenko, N. F., Derkach, A. I. (1981) *Taraxacum officinale* coumarins. *Khim. Prir. Soedin.* **4**, 519.

Lin, Z., Neamati, N., Zhao, H., Kiryu, Y., Turpin, J.A., Aberham, C., Strebel, K., Kohn, K., Witvrouw, M., Pannecouque, C., Debyser, Z., Clercq, E.D., Rice, W.G., Pommier, Y., Burke, T.R. (1999) Chicoric acid analogues as HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **42**, 1401-1414.

Livney, Y.D. (2009) Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid. In.* **15**, 73-83.

Lozano-Vazquez, G., Lobato-Calleros, C., Escalona-Buendia, H., Chavez, G., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2015) Effect of the weight ratio of alginate modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. *Food Hydrocolloids.* **48**, 301-311.

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

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Liliana Jiménez (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 230-242.

Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J. Med. Plants Res.* **2**, 321-330.

Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* **1**, 1806-1815.

Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley and Sons, New York.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Int. J. Pharmacogn. Phyt. Res.* **2**, 270-278.

Park, C.M., Jin, K.S., Lee, Y.W., Song, Y.S. (2011) Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF- κ B translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **660**, 454-459.

Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M. (2012) A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *Int. J. Pharm. Sci.* **4**, 27-32.

- 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. *Sci. Dir.* **26**, 1231-1237.
- Risch, S.J. (1995) Encapsulation: Overview of uses and techniques. U: Encapsulation and controlled release of food ingredients, (Risch, S.J., Reineccius, G., ured.), ACS Symposium Series, Washington, str. 2-64.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **22**, 2073-2085.
- Schütz, K., Carle, R., Schieber, A. (2006) *Taraxacum* - A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Sci. Dir.* **107**, 313-323.
- Schutz, K., Kammerer, D.R., Carle, R., Schieber, A. (2005) Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry Rapid Commun. *J. Nutr.* **19**, 179-186.
- Sharma, R., Singh, R.B. (2010) Bioactive foods and nutraceutical supplementation criteria in cardiovascular protection. *Sci. Dir.* **3**,141-153.
- Singh, M.N., Hemant, K.S.Y., Ram, M., Shivakumar, H.G. (2010) Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Res. Pharm. Sci.* **55**, 65-77.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Method Enzymol.* **299**, 1179.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R.M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Method Enzymol.* **299**, 152.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Sci. Dir.* **16**, 144-158.

- Stoica, R., Pop, S.F., Ion, R.M. (2013) Evaluation of natural polyphenols entrapped in calcium alginate beads prepared by the ionotropic gelation method. *J. Optoelectron. Adv. M.* **15**, 893-898.
- Stojanovic, R., Belcak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J. Sci. Food* **92**, 685-696.
- Sun, Z., Su, R., Qiao, J., Zhao, Z., Wang, X. (2014) Flavonoids extraction from *Taraxacum officinale* (Dandelion): Optimisation using response surface methodology and antioxidant activity. *J. Chem.* **2014**, 1-7.
- Umer, H., Nigam, H., Tamboli, A.M., Nainar, S.M. (2011) Microencapsulation: process, techniques and applications. *Sci. Dir.* **2**, 474-481.
- Vladisavljevic, G.T. (2012) Encapsulation techniques. U: Encyclopedia of membranes, (Drioli, E., Giorno, L., ured.), Heidelberg: Springer Reference, New York/London, str. 11-13.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S.E. (2010) Materials for encapsulation. U: Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing, (Zuidam, N.J., Nedović, V.A., ured.), Springer Science+Business Media, New York/London, str. 31-100.
- Williams, C.A., Goldstone, F., Greenham, J. (1995) Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* **42**, 121-127.
- Wolbis, M., Krolikowska, M. (1985) Polyphenolic compounds of dandelion (*Taraxacum officinale*). *Acta. Pol. Pharm. Drug. Res.* **42**, 215-21.
- Wolbis, M., Królikowska, M., Bednarek, P. (1993) Polyphenolic compounds in *Taraxacum officinale*. *Acta. Pol. Pharm. Drug. Res.* **50**, 153-8.
- Yong-Lee, K., Hong-Yuk, S. (2007) Polymeric protein delivery systems. *Sci. Dir.* **32**, 669-697.

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 active food ingredients and food processing, (Zuidam, N.J., Nedovic, V., ured.), Springer, New York/London, str. 3-29.