

Potencijal zelene kave u sustavu alginatnih nosača za inkapsulaciju polifenola ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) i maslačka (*Taraxacum officinale* L.)

Brenko, Natali

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:238235>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Natali Brenko

6939/BT

**POTENCIJAL ZELENE KAVE U SUSTAVU ALGINATNIH NOSAČA
ZA INKAPSULACIJU POLIFENOLA RUŽMARINA
(*Rosmarinus officinalis* L.) I MASLAČKA (*Taraxacum officinale*
L.)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija uživala

Mentor: Prof.dr.sc. Draženka Komes

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

POTENCIJAL ZELENE KAVE U SUSTAVU ALGINATNIH NOSAČA ZA INKAPSULACIJU POLIFENOLA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.) I MASLAČKA (*Taraxacum officinale* L.) Natali Brenko, 6939/BT

Sažetak: Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) i maslačak (*Taraxacum officinale* L.) su ljekovite biljne vrste široko rasprostranjene na području Hrvatske, a od davnina se koriste u tradicionalnoj medicini za liječenje različitih oboljenja zahvaljujući svom bogatom bioaktivnom sastavu, posebice polifenolnim spojevima. Budući da polifenolni profil maslačka još uvijek nije dovoljno istražen, a podaci o inkapsulaciji polifenolnih spojeva ružmarina i maslačka su limitirani, cilj ovog rada bio je karakterizirati polifenolne ekstrakte ružmarina i maslačka spektrofotometrijskim metodama te iste imobilizirati u različite sustave nosača na bazi alginata primjenom ionskog geliranja. Za inkapsulaciju polifenola ružmarina (R) i maslačka (M) korišten je alginat (A) te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke (A-IPS) te zelenom kavom (A-ZK), s naglaskom na ispitivanju potencijala zelene kave kao novog materijala za inkapsulaciju. Dobivenim hidrogel česticama određen je udjel vode, fizikalne i morfološke karakteristike, inkapsulacijska učinkovitost polifenola i sposobnost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, kao i kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Analiza ekstrakata ružmarina i lista maslačka pokazala je da je udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet bio veći u ekstraktu ružmarina. Kod obje biljne vrste, dodatak izolata proteina sirutke u alginat rezultirao je smanjenjem veličine hidrogel čestica, dok je dodatak zelene kave uzrokovao povećanje veličine čestica. Dodatak izolata proteina sirutke i zelene kave u alginatni gel rezultirao je povećanjem inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina te povećanjem stupnja zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, pri čemu se dodatak izolata proteina sirutke pokazao najučinkovitijim (npr. % imobilizacije ukupnih polifenola za A-IPS iznosio je 94,33% za R i 90,15% za M). Najbolji profil otpuštanja svih ispitivanih parametara imao je sustav A-ZK, gdje je otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, u obje biljne vrste, bilo kontinuirano kroz svih 140 minuta u gastrointestinalnim uvjetima. Zelena kava, kao novi materijal u sustavu nosača, pokazala je velik potencijal za inkapsulaciju polifenola ljekovitog bilja.

Ključne riječi: alginat, ionsko geliranje, maslačak, polifenoli, ružmarin, zelena kava

Rad sadrži: 52 stranica, 14 slika, 6 tablica, 82 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof.dr.sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Arijana Bušić, mag.ing.

Datum obrane: Lipanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery product
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

THE POTENTIAL OF GREEN COFFEE IN ALGINATE DELIVERY SYSTEMS FOR ENCAPSULATION OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) AND DANDELION (*Taraxacum officinale* L.) POLYPHENOLS
Natali Brenko, 6939/BT

Abstract: Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and dandelion (*Taraxacum officinale* L.) are medicinal herbs widely spread in Croatia, and they have been used for years in traditional medicine for healing various diseases due to their rich bioactive composition, especially polyphenolic compounds. Since the polyphenol profile of dandelion has still not been sufficiently investigated, and data on encapsulation of rosemary and dandelion polyphenols is lacking, the aim of this study was to characterize rosemary and dandelion polyphenolic extracts by spectrophotometric methods and immobilize the extracts in various alginate-based delivery systems using ionic gelation. As a carrier for the encapsulation of polyphenols from rosemary (R) and dandelion (D) alginate (A) and its combination with whey protein isolates (A-WPI) and green coffee (A-GC) was used, with emphasis on the evaluation of a potential of green coffee as a new encapsulation material. Obtained hydrogel beads were investigated for water content, physical and morphological characteristics, encapsulation efficiency of polyphenols and retained antioxidant capacity, and for release profile of polyphenols and antioxidant capacity from hydrogel beads in simulated gastrointestinal conditions.

The analysis of rosemary and dandelion leaf extracts showed that the content of total polyphenols, hydroxycinnamic acids and antioxidant capacity was higher in rosemary extract. In both herbal species, the addition of whey protein isolates in alginate resulted with size reduction of hydrogel beads, while the addition of green coffee resulted in increase of particle size. The addition of whey protein isolates and green coffee in alginate gel resulted in higher encapsulation efficiency of total polyphenols, hydroxycinnamic acids and higher retention of antioxidant capacity, whereby the addition of whey protein isolates was the most efficient (e.g. % of total polyphenols immobilization for A-WPI was 94,33% for R and 90,15% for D). The best release profile of all tested parameters was determined in system A-GC, where the release of total polyphenols and hydroxycinnamic acids, in both herbal species, was continuous through all 140 minutes in gastrointestinal conditions. Green coffee, as a new carrier material, has shown a great potential for encapsulation of polyphenol from medicinal herbs.

Keywords: alginate, ionic gelation, dandelion, polyphenols, rosemary, green coffee

Thesis contains: 52 pages, 14 figures, 6 tables, 82 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: Arijana Bušić, BSc

Defence date: June 2017

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Ljekovito bilje	3
2.1.1. Antioksidansi u ljekovitom bilju	3
2.2. Ružmarin	4
2.2.1. Tradicionalna uporaba ružmarina.....	4
2.2.2. Kemijski sastav ružmarina	5
2.3. Maslačak	6
2.3.1. Tradicionalna uporaba maslačka	6
2.3.2. Kemijski sastav maslačka	6
2.4. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva	7
2.5. Inkapsulacija.....	8
2.5.1. Ionsko geliranje alginata	9
2.5.2. Inkapsulacija polifenola ružmarina i maslačka.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijal.....	12
3.1.1. Uzorci	12
3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta ružmarina i maslačka	12
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola	15
3.2.2. Određivanje udjela hidrokisimernih kiselina.....	16
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	17
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	19
3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina i maslačka u sustave nosača na bazi alginata	20
3.2.6. Karakterizacija čestica	21
3.2.6.1. Određivanje udjela vode.....	21
3.2.6.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika hidrogel čestica	22
3.2.6.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica	22
3.2.6.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta	24
3.2.6.5. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	24
3.2.6.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom.....	25
4. REZULTATI I RASPARAVA	26
4.1. Karakterizacija polifenolnih ekstrakta ružmarina i maslačka.....	27
4.2. Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka	28

4.3. Fizikalne i morfološke karakteristike formiranih hidrogel čestica	29
4.4. Određivanje parametara boje formiranih čestica	32
4.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta	33
4.6. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijski kapacitet iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka	36
4.7. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode	40
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Unatoč razvoju farmaceutske industrije, posebice tijekom posljednjih dvadesetak godina, koji je rezultirao sintezom novih lijekova i omogućio liječenje različitih neizlječivih i/ili po život opasnih bolesti, u novije vrijeme u svrhu liječenja postaje sve popularnija uporaba tradicionalnog, ljekovitog bilja, kao prirodnih izvora različitih bioaktivnih sastojaka. Tijekom godina utvrđeno je da sintetski lijekovi imaju mnogo neželjenih nuspojava, toksični su te često neefikasni. U svrhu prevencije i liječenja različitih bolesti te sve veće rezistencije patogenih mikroorganizama na postojeće lijekove razvila se potreba za istraživanjem novih aktivnih sastojaka iz prirodnih izvora, poput ljekovitog bilja (Ahmad i sur., 2006).

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je ljekovita biljka koja je zaokupila interes znanstvenika zbog svog bogatog bioaktivnog sastava, posebice visokog udjela polifenola, te istaknutog pozitivnog djelovanja na imunitet, antioksidacijskih, antitumornih i antimikrobnih svojstava (Arranz i sur., 2015). Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je biljna vrsta koja se od davnina koristi u narodnoj medicini, no, u današnje vrijeme samo mali dio znanstvenih radova bavi se istraživanjem djelotvornosti aktivnih spojeva maslačka. Najvažniji aktivni sastojak maslačka, koji doprinosi visokom antioksidacijskom potencijalu i pozitivnim zdravstvenim učincima na ljudsko zdravlje je čikorinska kiselina (Chkhikvishvili i sur., 2001).

No unatoč brojnim pozitivnim benefitima za ljudski organizam polifenoli ljekovitog bilja su jako nestabilni spojevi. U svrhu smanjenja njihove nestabilnosti tijekom proizvodnje i nakon oralne konzumacije potrebno je očuvati integritet strukture polifenola. Među postojećim metodama stabilizacije polifenolnih spojeva tehnika inkapsulacije nameće se kao najučinkovitija tehnika zaštite istih, budući da povećava njihovu nisku bioraspoloživost i topljivost u vodi, transportira ih u željeni dio tijela te rezultira maskiranjem često gorkog okusa polifenola (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Alginat je prirodni anionski polisaharid koji se vrlo često koristi za inkapsulaciju aktivnih spojeva zbog svojih poželjnih svojstava, poput biokompatibilnosti, široke rasprostranjenosti i niske cijene (Pawar i sur., 2012). No, unatoč svim pozitivnim karakteristikama mikročestice dobivene ionskim geliranjem alginata su porozne pa se često kombiniraju s drugim biopolimerima.

Cilj ovog rada je inkapsulacija polifenolnih ekstrakata ružmarina i lista maslačka u sustave nosača na bazi alginata metodom ionskog geliranja. U svrhu smanjenja poroznosti alginatnog gela, alginat će se kombinirati s izolatima proteina sirutke i zelenom kavom, s

posebnim naglaskom na ispitivanje potencijala zelene kave kao nove sirovine koja do sada nije korištena u sustavu nosača za inkapsulaciju. Prvotno će se provesti bioaktivna karakterizacija vodenih polifenolnih ekstrakata ružmarina i maslačka primjenom spektrofotometrijskih metoda. Nakon provedene inkapsulacije, dobivenim hidrogel česticama na bazi alginata s imobiliziranim polifenolima ružmarina i maslačka odredit će se udjel vode, fizikalne i morfološke karakteristike, parametri boje te stupanj inkapsulacije polifenola (ukupni polifenoli i hidroksicimetne kiseline) i sposobnost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta (ABTS i DPPH metode). Također, ispitat će se profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih hidrogel čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ljekovito bilje

Ljekovito bilje tradicionalno se koristi u narodnoj medicini kao „prirodni lijek“ za liječenje i prevenciju različitih oboljenja (kardiovaskularna, gastrointestinalna, prevencija pojave carcinoma) jer djeluje protuupalno, kao diuretik, sedativ, digestiv, koagulans, kod prevencije kardiovaskularnih oboljenja, gastrointestinalnih poremećaja te u prevenciji pojave carcinoma. Zbog prisutnosti različitih aktivnih spojeva, farmaceutska industrija koristi ljekovito bilje kao agense za proizvodnju lijekova, dok se u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji ljekovito bilje najčešće koristi kao aditiv zbog antioksidacijskih svojstava i antimikrobne aktivnosti. Ljekovito bilje koje se u svijetu najčešće koristi upravo zbog svoje visoke antioksidacijske aktivnosti pripada porodicama *Lamiaceae* (ružmarin, kadulja, origano, bosiljak), *Apiaceae* (kumin, koromač, oguljak), *Zingiberaceae* (đumbir, kurkuma), *Ginkgoaceae* (ginko), *Asteraceae* (artičoke, maslačak, kamilica) i *Myrtaceae* (eukaliptus, manuka, guava). Dijelovi ljekovitog bilja (lišće, korijenje, sjemenke, cvjetovi) mogu se koristiti na različite načine, u svježem i suhom obliku, kao biljne infuzije, dekokcije, u praškastom obliku ili u obliku ekstrakta (sokovi, vodeni ili alkoholni ekstrakti, tinkture, esencijalna ulja, balzami) (Škrovánková i sur., 2012).

2.1.1. Antioksidansi u ljekovitom bilju

Antioksidansi su spojevi koji pomažu u prevenciji bolesti kao što su karcinomi, dijabetes, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti te sprječavaju preuranjeno starenje (Aguiar i sur., 2017). Pod pojmom antioksidansi podrazumijevaju se spojevi koji imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, čiji izvori slobodnih radikala mogu biti egzogeni (pušenje, pesticidi, ozon) i endogeni (ljudsko tijelo) (Škrovánková i sur., 2012.). U usporedbi sa sintetičkim antioksidansima, u posljednje vrijeme povećava se interes za prirodnim izvorima antioksidansa, što se može pripisati većoj osvještenosti kupaca o utjecaju prehrane na ljudsko zdravlje pa time i njihovoj preferenciji za organskim sirovinama koje su bogate prirodnim polifenolima te se vezuju uz manje nuspojave (Guan i sur., 2005; Embuscado, 2015). Ljekovito bilje predstavlja značajan izvor antioksidansa kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, terpeni, tokoferoli, askorbinska kiselina (vitamin C) te karotenoidi. Navedeni antioksidansi mogu djelovati pojedinačno ili u kombinaciji s drugim polifenolima pri čemu je taj sinergistički učinak

često djelotvorniji (Dai i Mumper, 2010). Antioksidansi iz biljnog materijala mogu se izdvojiti iz svježeg ili osušenog bilja primjenom raznih tehnika ekstrakcija kao što su konvencionalne ekstrakcije otapalima (polarna i nepolarna otapala), ekstrakcija superkričnim fluidima, ultrazvukom i mikrovalovima i drugim (Škrovánková i sur., 2012). Koncentracija i vrsta antioksidansa varira ovisno o varijetetu biljke, okolišnim uvjetima, klimatskim promjenama, sezonskim varijacijama, stupnju zrelosti, načinu uzgoja, geografskom području te o mnogim drugim faktorima (Yesil-Celiktas i sur., 2007).

2.2. Ružmarin

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (slika 1), porodica *Lamiaceae*, je zimzeleni višegodišnji grm koji doseže visinu od 2 m. Listovi su mu uvijeni, kožasti i linearni, gornja površina lista je tamno zelena, dok je donja sive boje. Postižu duljinu od 1,0 do 2,5 cm, širinu 4 cm te debljinu od 1 do 3 mm. Cvjetovi su sitni, svijetloplave do lila boje (Lorenzi i de Abreu Matos, 2002). Listovi i cvjetovi imaju snažan karakterističan miris koji je posljedica nakupljanja aromatičnog ulja (Marin i sur., 2006). Ružmarin raste spontano na pijesku, klifovima i kamenju, u blizini mora te ga nalazimo u različitim dijelovima svijeta, poput Europe, Afrike i Azije (Giachetti i sur., 2010).



Slika 1. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Anonymous 1, 2015)

2.2.1. Tradicionalna uporaba ružmarina

Ružmarin je poznat kao začinska biljka u mnogim zemljama gdje je također i uobičajeni sastojak pripravaka koji se koriste u narodnoj medicini. Nadzemni dijelovi biljke koriste se za oralnu primjenu zbog svojih antiupalnih svojstava, protiv migrene, bolova u abdomenu, zacjeljivanje rana, kao diuretik, analgetik, antireumatik i antidepresiv (Karakurum Göksel i sur., 2014). Dekokcije, infuzije, eterično ulje i ekstrakti cijele biljke koriste se kod probavnih smetnji, srčanih tegoba, upala, nekih zaraza i kod poboljšanja pamćenja (Sasikumar, 2012). Ružmarin se

u prehrambenoj industriji koristi kao konzervans zbog visokog udjela antioksidansa (Sotelo-Félix i sur., 2002). Dokazano je da ekstrakt ružmarina i određeni izolirani spojevi imaju inhibitorno djelovanje na rast raka dojke, prostate, pluća, jetre, a učinkoviti su i u liječenju leukemije (Carnosol, 2011; Johnson i sur., 2010).

2.2.2. Kemijski sastav ružmarina

Prema nutritivnoj vrijednosti ružmarina ustanovljeno je da 100 g svježeg ružmarina (USDA) sadrži sljedeće komponente (g/100 g): voda (67,77), proteini (3,31), masti (5,86), ugljikohidrati (20,70) i vlakna (14,10). Osim navedenih komponenti ružmarin je bogat vitaminima i mineralnim tvarima (mg/100 g) od kojih najviše sadrži kalij (1961,2), kalcij (1234,3), natrij (437,7), magnezij (261,8), fosfor (210,6), vitamin A (146), folnu kiselinu (109) i askorbinsku kiselinu (21,8) (USDA) (Arslan i Özcan, 2008). Spojevi koji su ključni za aromatski profil ružmarina su monoterpeni hidrokarboni, oksidirani monoterpeni, seskviterpeni hidrokarboni, oksidirani seskviterpeni, esteri, ketoni, fenoli, alkoholi i drugi (Teixeira i sur., 2013). Među najzanimljivije komponente ružmarina ubrajaju se polifenoli od kojih su najznačajniji ($\mu\text{g/g}$ suhe tvari) ružmarinska kiselina (156,90), *p*-hidroksibenzojeva kiselina (15,16), kafeinska kiselina (12,58), protokatehinska kiselina (8,24) i *p*-kumarinska kiselina (5,57) (Vallverdú-Queralt i sur., 2014). Ukupni polifenolni sastav ružmarina varira ovisno o načinu ekstrakcije polifenola iz biljke (Tablica 1).

Tablica 1. Udjel ukupnih polifenola ružmarina ovisno o ekstrakcijskoj tehnici

Ekstrakcijska tehnika	Ukupni polifenoli (mg klorogenske kiseline/g)	Referanca
Maceracija u etanolu (3x48h)	18,5 - 40,7	Ben Jemia i sur., 2013
Ekstrakcija superkričnim CO ₂	177,61	Valdés i sur., 2014
Topla voda s 1% HCl	15,35	Bunghez i sur., 2015b
Destilacija parom uz ekstrakciju acetonom	25	Moreno i sur., 2016

2.3. Maslačak

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) (slika 2) je trajna zeljasta višegodišnja biljka iz porodice *Asteraceae* (Popescu i sur., 2010). Maslačak je biljka sa snažnim vretenastim korijenom i listovima združenim u prizemnu rozetu. Rozetu čine listovi priligli uz tlo, koji se tek u kasnijem razvoju uspravljaju (Lesinger, 1999). Cjevasta cvjetna stabljika je okrugla i nosi žutu cvatnu glavicu koja se noću i za vrijeme kiše zatvara. Maslačak je samonikla biljka čitave sjeverne polutke, a dolazi često u velikom broju na travnatim površinama, djeteliništima, napuštenim njivama, vrtovima, i to od nizinskog do pretplaninskog pojasa (Toplak, 2005).



Slika 2. Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) (Anonymous 2, 2016)

2.3.1. Tradicionalna uporaba maslačka

Biljne infuzije i ekstrakti maslačka koriste se od davnina u narodnoj medicini kao laksativi, diuretici, potencijalni antidijabetici (Önal i sur., 2005), pripravci za pojačanje imunološkog odgovora prilikom infekcija gornjeg respiratornog sustava, bronhitisa i upale pluća (Shütz i sur., 2006). Maslačak kao promotor zdravlja ima i antireumatska, antiinflamatorna, antikancerogena i hipoglikemijska svojstva (Koh i sur., 2010). Listovi maslačka pomažu kod prevencije anemije zbog visoke koncentracije željeza te pomažu u razvoju jetre kod fetusa (Lans i sur., 2007). Ekstrakti maslačka posjeduju protuupalna svojstva te imaju snažnu anti-retrovirusnu aktivnost, antioksidativne i hepatoprotektivne učinke (Ivanov, 2014).

2.3.2. Kemijski sastav maslačka

Biljka maslačka sadrži gorku tvar kolin, zatim škrob (koji se kod dužeg čuvanja pretvara u voćni šećer), saponine, masti, tragove eteričnog ulja, vosak, sluz, šećer, bjelančevine, levulin i

taraksin. Korijen maslačka sadrži još i značajan udjel kalija, kalcija, mangana, natrija, kremičnu kiselinu, sumpor i vitamin C. Udjel vitamina C izrazito je visok u proljeće u mladim listovima. Sadržaj kemijskih spojeva u dijelovima biljke maslačka mijenja se ovisno o godišnjem dobu. Svježi korijen, iskopan u proljeće (od sredine ožujka do sredine travnja), sadrži većim dijelom gorku tvar, dok se prema sredini kolovoza umjesto mliječnog soka stvara inulin, a u listopadu u korijenu je najveći udjel tarakserina i levulina (Willfort, 2002). Analizom ekstrakata maslačka pomoću HPLC-a detektirano je šest fenolnih kiselina: klorogenska, kafeinska, *p*-kumarinska, sinapinska, ferulinska i čikorinska. Među identificiranim fenolnim kiselinama najzastupljenija fenolna kiselina je čikorinska kiselina (1195 mg/100g suhe tvari) (Ivanov, 2014). Bioaktivni profil različitih dijelova maslačka prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Biokativni profil različitih dijelova maslačka (Hudec i sur., 2007)

Bioaktivni profil	Korijen	Stabljika	List	Cvijet
Antioskidacijska aktivnost (%)	13,22	35,00	31,43	7,14
Antiradikalna aktivnost (%)	83,43	78,86	61,14	82,29
Ukupni polifenoli (mg galne kiseline/g suhe tvari, 765 nm)	-	-	5,38	12,66
Hidroksibenzojeva kiselina (mg galne kiseline/g suhe tvari, 280 nm)	-	-	1,14	0,68
Flavonoidi (mg kvercetina/g suhe tvari, 360 nm)	-	-	1,30	4,50
Antocijanini (mg cijanidin-3 glukozida/g suhe tvari, 520 nm)	-	-	2,56	7,79
Suha tvar (%)	15,31	8,80	14,36	14,79

2.4. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva

Prirodni polifenoli su snažni antioksidansi koji komplementiraju funkcije antioksidacijskih vitamina i enzima kao obranu protiv oksidacijskog stresa izazvanog viškom reaktivnih kisikovih vrsta, što ih čini učinkovitima u liječenju različitih bolesti (Tsao, 2010). No, primjena ovih visoko vrijednih spojeva je veoma ograničena. Na temelju istraživanja dokazano je da je koncentracija polifenola izmjerena *in vitro* znatno veća od koncentracije polifenola izmjerene *in vivo*. Učinkovitost polifenola ovisi o njihovoj bioraspoloživosti i integritetu. Nakon oralne primjene mali

se dio polifenolnih spojeva apsorbira u organizmu, a razlog tome je nedovoljno vrijeme zadržavanja u probavnom sustavu, niska permeabilnost i/ili topljivost. Također, polifenolna nestabilnost tijekom proizvodnje hrane, distribucije ili skladištenja te nestabilnost u probavnom sustavu (pH, enzimi, prisutnost drugih tvari) limitira potencijalno pozitivne učinke polifenola na zdravlje ljudi. Široka primjena također je otežana uslijed osjetljive prirode polifenola na različite okolišne čimbenike. Polifenoli vrlo brzo oksidiraju što dovodi do posmeđivanja, neželjenog mirisa i gubitka aktivnosti proizvoda. Kako bi se proširila primjena polifenola potrebno je razviti sustav koji omogućava održavanje stabilnosti i integriteta polifenola, maskira njihov gorak okus, poveća im topljivost u vodi i bioraspoloživost te omogućava njihov prijenos i djelovanje na željenom mjestu. U tu svrhu kao učinkovito rješenje nameće se tehnika inkapsulacije polifenolnih spojeva u zaštitne sustave nosača (Munin i sur., 2011).

2.5. Inkapsulacija

Inkapsulacija je proces pakiranja ili imobilizacije aktivnog sastojka koji može biti čvrst, tekuć ili plinovit, u stabilniji sekundarni zaštitni materijal koji omogućava kontrolirano otpuštanje aktivnog sastojka pod specifičnim uvjetima (Vilstrup, 2001).

Postoji mnogo metoda inkapsulacije koje se mogu klasificirati u sljedeće skupine:

- Fizikalne metode: sušenje raspršivanjem, sferizacija ekstruzijom, centrifugalna ekstruzija, procesi koji koriste superkritične fluide;
- Fizikalno-kemijske metode: hlađenje raspršivanjem, ionsko geliranje, ekstrakcija otapala isparavanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija;
- Kemijske metode: granična polimerizacija, *in situ* polimerizacija, umreživanje itd. (Munin i sur., 2011).

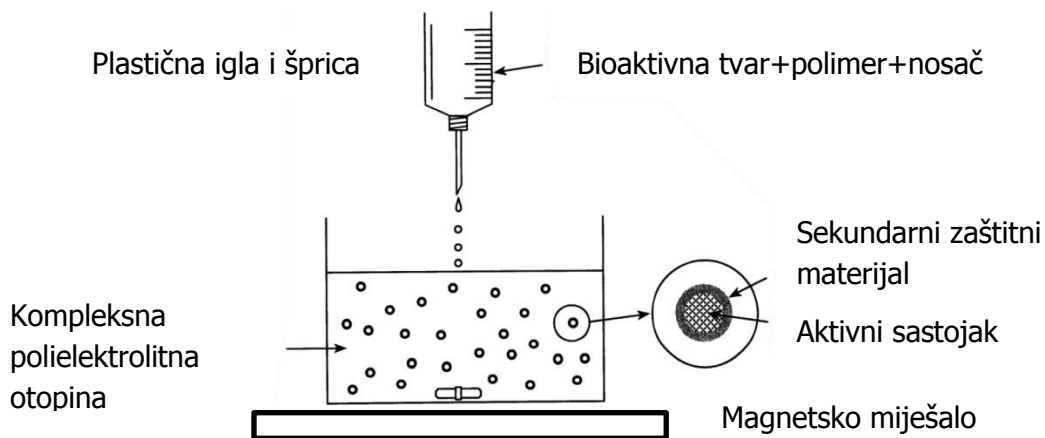
Dobivene čestice s obzirom na veličinu dijele se na nanočestice (10-1000 nm), mikročestice (2-2000 μm) i makročestice (>2000 μm) (Singh i sur., 2010). Veličina čestica ovisi o metodi inkapsulacije pa će tako kod sušenja raspršivanjem čestice imati veličinu od oko 10 mikrometara, dok će kod ko-kristalizacije biti između 2 i 30 mikrometra (Munin i sur., 2011).

Inkapsulacija u prehrambenoj industriji i biotehnologiji obuhvaća inkorporiranje prirodnih sastojaka, polifenola, hlapljivih aditiva, enzima i bakterija u male kapsule pri čemu je omogućena stabilnost, zaštita i konzerviranje proizvoda s inkapsuliranim spojevima (Nazzaro i

sur., 2011). Najvažnije prednosti mikroinkapsuliranih sastojaka namijenjenih primjeni u prehrambenoj industriji su puno lakše rukovanje s aktivnim sastojkom (npr. konverzija tekućeg aktivnog sastojka u praškasti, koji može biti bez prašine, slobodno teći i imati neutralniji miris), imobilizacija aktivnog sastojka unutar prehrambenog proizvoda, poboljšana stabilnost u finalnom proizvodu i tijekom procesiranja (npr. smanjeni gubici hlapivog aktivnog sastojka i/ili sprječavanje degradacije ili reakcije s drugim tvarima koje su prisutne u prehrambenom proizvodu poput kisika ili vode), poboljšana sigurnost (npr. smanjenje zapaljivosti hlapivih tvari poput arome, nema rukovanja s koncentriranim hlapivim uljima), kreiranje vidljivih efekata i privlačne teksture (vizualni efekt), podesiva svojstva aktivnih sastojaka (veličine čestice, struktura, topivost u vodi odnosno u ulju, boja), maskiranje nepoželjnog okusa, i osigurano kontrolirano otpuštanje (diferencijacija, otpuštanje uz odgovarajuće popratne faktore) (Munini i sur., 2011).

2.5.1. Ionsko geliranje alginata

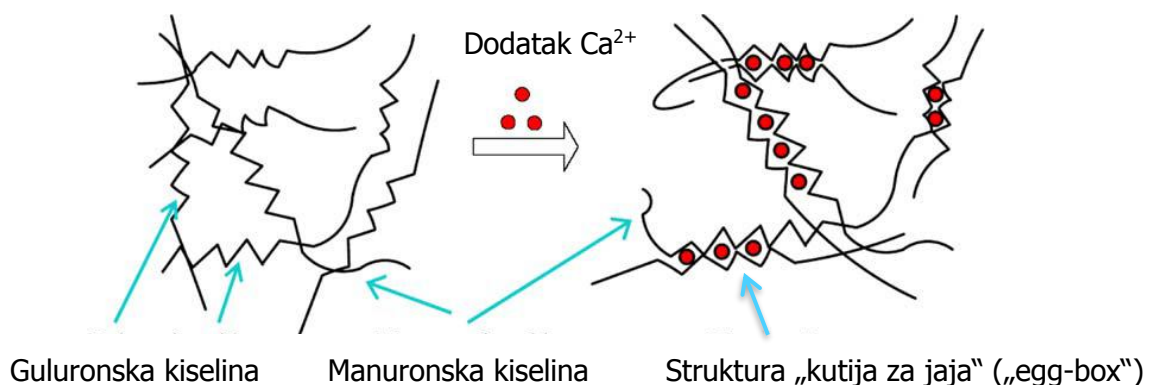
Ionsko geliranje je proces koji se sastoji od istiskivanja vodene otopine polimera u kojoj je otopljen aktivni materijal u otopinu gelirajućeg medija pri čemu nakon kemijske reakcije dolazi do tvorbe sferičnih kuglica (slika 3) (Vandamme i sur., 2007).



Slika 3. Shematski prikaz pripreme čestice na bazi polisaharida metodom ionskog geliranja (Anonymous 3, 2003)

Materijali koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju aktivnih spojeva moraju imati GRAS status. Nosači koji su pogodni za sintezu čestica hidrofilne prirode su polisaharidi (alginat, pektin, guma arabika, karagenan, kitozan), polimeri (polilaktična-*co*-glikolinska kiselina), poliorganofosfazeni, polilaktička kiselina, lipidi (fosfolipidi, masne kiseline), proteini (proteini sirutke i soje, kazein) i surfaktanti (polisorbati, sojin lecitin, lecitin jaja) (Patel i sur., 2011). Posljednjih godina velika pažnja pridaje se uporabi polimernih nosača iz prirodnih izvora jer ih karakterizira obnovljivost, biorazgradivost, biokompatibilnost i netoksičnost (Messoud i sur., 2016). Jedan od prirodnih polimera koji je pogodan kao nosač prilikom inkapsulacije je alginat.

Alginat je prirodni anionski polisaharid koji se koristi za inkapsulaciju aktivnih spojeva zbog svojih zanimljivih fizikalno-kemijskih svojstava, poput biokompatibilnosti, široke rasprostranjenosti i niske cijene (Pawar i sur., 2012). Alginat se sastoji od linearnih lanaca α -L-guluronske kiseline i β -D-manuronske kiseline povezane α -1,4-glikozidnom vezom te se u većini slučajeva ekstrahira iz smeđih algi. Najznačajnija karakteristika alginata je njegova sposobnost stvaranja gela koja se inducira umrežavanjem s različitim dvovalentnim kationima, osim Mg^{2+} (Zhao i sur., 2010). Divalentni kationi vežu se za guluronske blokove alginatnih lanaca. Guluronski blokovi jednog polimera stvaraju zatim veze sa susjednim polimerinim lancima, pri čemu se stvara struktura poznata pod nazivom „kutija za jaja“ („egg-box“) i rezultira formiranjem gel strukture (slika 4). Kalcijev klorid ($CaCl_2$) jedan je od najčešće korištenih gelirajućih medija prilikom ionskog geliranja (Lee i Mooney, 2011).



Slika 4. Geliranje alginata pomoću kalcijevih iona i formacija strukture „kutije za jaja“ („egg-box“) (Wan i sur., 2008)

2.5.2. Inkapsulacija polifenola ružmarina i maslačka

Ružmarin i maslačak od davnina su prepoznati kao ljekovito bilje s mnogobrojnim zdravstvenim učincima. Iako je njihova uporaba široko rasprostranjena, puni potencijal ovih biljnih vrsta nije u potpunosti iskorišten. Unatoč poznavanju zdravstvenih učinaka polifenola ružmarina i maslačka te njihovoj sve većoj upotrebi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, samo je nekolicina znanstvenih skupina istraživala imobilizaciju polifenolnih spojeva ružmarina i maslačka, gdje je u odnosu na maslačak inkapsulacija ekstrakata i spojeva ružmarina više istraživana. Prema literaturi, inkapsulacija ekstrakata ružmarina do sada se provela koagulacijom vodenog ekstrakta ružmarina geliranjem alginata pomoću kalcija (Ribeiro i sur., 2016), inkapsulacijom u emulziji vode i ulja ružmarina ekstrahiranog superkričnim fluidom (Arranz i sur., 2017), imobilizacijom ekstrakta ružmarina, dobivenog toplom i hladnom ekstrakcijom, te sušenjem raspršivanjem primjenom maltodekstrina (Bunghez i sur., 2015a). Podaci o inkapsulaciji polifenolnog ekstrakta maslačka su ograničeni, te je prema pretraženoj znanstvenoj literaturi, ekstrakt cvijeta maslačka inkapsuliran je ionskim geliranjem alginata i pektina u emulzijama u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Također, u radu Wang i suradnika (2016) polifenoli čaja maslačka imobilizirani su sušenjem raspršivanjem uz nosač hidroksipropil metilcelulozu ftalat.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

U svrhu inkapsulacije polifenolnih spojeva, u ovom radu korišteno je suhi ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (berba 2015. godina), podrijetlom s Visa i sešeni listovi maslačka (*Taraxacum officinale* L.) (berba 2014. godina), podrijetlom iz Koprivničko-križevačke županije. Uzorci su kupljeni u trgovini specijaliziranoj za prodaju ljekovitog bilja, Suban d.o.o. (Strmes Samoborski, Hrvatska). Biljni uzorci su prije ekstrakcije usitnjeni do praškaste teksture i prosijani radi postizanja ujednačene veličine čestica.

Natrijeva sol alginske kiseline iz smeđih algi, niske viskoznosti korištena je kao glavni nosač za inkapsulaciju polifenola ružmarina i lista maslačka, dok su izolati proteina sirutke i zelena kava korišteni kao dodatni materijali u sustavu alginata.

3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta ružmarina i maslačka

Ekstrakti ružmarina (R) i maslačka (M) pripremljeni su prelijevanjem 20 g usitnjenog uzorka s 200 mL destilirane vode, temperature 80°C. Ekstrakcija se provodila kroz vremenski period od 30 minuta uz konstantno miješanje i pri konstantnoj temperaturi od 80°C. Nakon ekstrakcije ekstrakti su procijeđeni kroz metalno cjedilo s nekoliko slojeva gaze te nadopunjeni do volumena od 200 mL i ohlađeni na sobnu temperaturu. Pripremljenim ekstraktima ružmarina i maslačka primjenom spektrofotometrijskih metoda određen je udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet (ABTS i DPPH metoda).

3.1.2. Kemikalije

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

Određivanje udjela ukupnih polifenola:

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina:

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

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom:

- Etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica:

- Natrijeva sol alginske kiseline niske viskoznosti Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Izolati proteina sirutke, Davisco Foods international (La Suer, SAD)
- Zelena kava (Etiopija)
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrij citrat, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)

- Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrij hidrogen *o*-fosfat bezvodni, Fisher Chemical (Loughborough, Velika Britanija)
- Natrij dihidrogenfosfat-dihidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela suhe tvari:

- Kvarcni pjesak (oprani i žareni), Gram-mo d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Aparatura i pribor

Priprema ekstrakta:

- Plamenik s azbestnom mrežicom
- Termometar
- Stakleni štapić
- Čaše volumena od 250 do 500 mL
- Menzura volumena 250 mL
- Štoperica
- Metalno cijedilo
- Gaze
- Električni mlin za kavu, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)

Spektrofotometrijske analize:

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

Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica:

- Plastične šprice volumena 2 i 5 mL
- Igle 27G (0,4x13) i 18G (18x40mm)
- Češe volumena od 80 do 250 mL
- Termometar
- Metalno cjedilo
- Plastične epice volumena 2 mL
- Plastične epruvete volumena 15 mL
- Magneti
- Aluminijska posudice s poklopcima
- Eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železnik, Slovenija)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Velika Britanija)
- Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak=0,2 mm) (Naarden, Nizozemska)
- TA.HDPlus analizator teksture, Stable Micro Systems (Godalming, Velika Britanija)
- Cilindrična čelična sonda P/2, Stable Micro Systems (Godalming, Velika Britanija)
- Kolorimetar, CM-700d, CM-A177, Konica Minolta (Tokio, Japan)
- Mikroskop Leica DM1000 LED (Cambridge, Velika Britanija)

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola (UP) 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).

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 apsorbancija 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 uzorka ili čestica.

3.2.2. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

Princip metode:

Određivanje hidroksicimetnih kiselina (HCA) bazira se na reakciji kiselinske hidrolize koja je popraćena nastankom ružičasto-crvenkastog obojenja, čiji se intenzitet određuje mjerenjem

apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

Postupak rada:

Za određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina, 500 µL uzorka pomiješa se u epruveti sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnov-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 (KK), 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 uzorka ili čestica.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno

generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbanije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbanije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS⁺ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 µL 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 apsorbanija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$.

Volumen od 40 µL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS⁺ radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbanija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbaniju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 µL vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Oduzimanjem apsorbanije uzorka od apsorbanije 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 apsorbanije pri 734 nm.

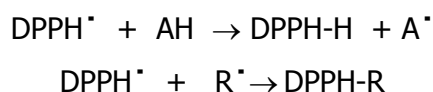
Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbanije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u

dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Troloxa/g uzorka ili čestica.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

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 nesporenog 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 apsorbanije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Postupak rada:

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

Oduzimanjem izmjerene apsorbanije uzorka od apsorbanije 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 apsorbanije 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 uzorka ili čestica.

3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina i maslačka u sustave nosača na bazi alginata

Postupak rada:

U ovome radu za dobivanje sustava nosača na bazi alginata korištena je 3%-tna (w/v) otopina alginata niske viskoznosti. Uz sustav s čistim alginatom (A), pripremljena su još dva sustava gdje se alginat kombinirao s izolatima proteina sirutke (A-IPS) i zelenom kavom (A-ZK), koja se do sada nije koristila kao materijal („filler“) za imobilizaciju polifenolnih spojeva. Navedene otopine nosača pripremljene su otapanjem natrijeva alginata, izolata proteina sirutke ili zelene kave u prethodno pripremljenom i ohlađenom ekstraktu ružmarina i maslačka (w/v). Binarni sustavi pomiješani su u omjeru 80% A : 20% IPS ili ZK (w/w). Sve otopine nosača otapane su na magnetskoj miješalici tijekom 24 h pri sobnoj temperaturi. Kao gelirajući medij u ovom istraživanju koristio se kalcijev klorid (CaCl₂). Otopine gelirajućeg medija pripremljene su otapanjem 3%-tnog kalcijevog klorida (w/v) u ekstraktu ružmarina i maslačka. U ovom istraživanju formirano je 6 različitih sustava nosača na bazi alginata s inkapsuliranim polifenolnim ekstraktima ružmarina i maslačka (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz formiranih sustava nosača za inkapsulaciju polifenola ružmarina i maslačka

Za formiranje navedenih hidrogel čestica korištena je metoda ionskog geliranja ukapavanjem. Volumen od 5 mL pripremljene otopine nosača prenesen je u plastičnu špricu te je istiskivan kroz iglu (od 27 G (0,4x13) za sustave A i A-IPS i 18 G (18x40mm) za sustav A-ZK) u prethodno pripremljenu otopinu 3% gelirajućeg medija u ekstraktu. Tijekom inkapsulacije otopina gelirajućeg medija je konstantno miješana na magnetskoj miješalici pri čemu su formirane sferične čestice. Nakon ukapavanja određenog volumena otopine nosača, čestice su u svrhu očvršćivanja miješane na magnetskoj miješalici dodatnih 30 min, nakon čega su profiltrirane, isprane odgovarajućim ekstraktom te spremljene u ekstrakte na +4°C do analiza. Također, pripremljene su kontrolne čestice na način kao i prethodno opisani sustavi nosača na bazi alginata, samo su iste umjesto ekstrakta ružmarina i maslačka sadržavale destiliranu vodu.

3.2.6. Karakterizacija čestica

3.2.6.1. Određivanje udjela vode

Princip metode:

Ova se metoda temelji na sušenju uzorka na temperaturi od 105°C do konstantne mase pri čemu se određuje masa suhe tvari. Pri navedenoj temperaturi sušenja dolazi do izdvajanja slobodne vlage iz uzorka. Udjel suhe tvari izračunava se na temelju početne mase uzorka koji se suši.

Postupak rada:

Aluminijske posudice s poklopcem i kvarcnim pijeskom su prethodno osušene, ohlađene i izvagane te je u njih odvagana masa od približno 0,3 g hidrogel čestica. Uzorci se suše oko 3 sata na 105°C u otklopljenim posudicama u sušioniku s automatskim temperaturnim regulatorom. Po završetku sušenja posudice se poklope i prenesu u eksikator, gdje se hlade do sobne temperature. Nakon što su se posudice ohladile na sobnu temperaturi provodi se vaganje na analitičkoj vagi. Udjel vode u uzorcima izračunava se na temelju gubitka mase prema dolje navedenoj 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.

3.2.6.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika hidrogel čestica

Veličina čestica određena je digitalnim fotoaparatom na Dino-Lite kalibracijskoj pločici (min.razmak = 0,2 mm), a rezultati veličine čestica izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja ($n=10$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

Analiza teksture (tvrdoća i elastičnost) provedena je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), opremljenom s utegom od 5 kg. Analize su provedene na sobnoj temperaturi na pet različitih čestica svakog sustava. U svrhu postizanja maksimalnog omjera kompresije i smicanja, za probijanje uzoraka korištena je cilindrična čelična sonda P/2 (Stable Micro Systems, Velika Britanija) s ravnim dnom, uz brzinu prodiranja od 0,5 mm/s.

Dobiveni dijagrami obrađeni su u Texture Exponent programu (Stable Micro Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za ispitivane parametre teksture. Tvrdoća uzorka izražena je kroz maksimalnu silu (N) potrebnu za kompresiju uzoraka, dok se maksimalna udaljenost sonde prilikom probijanja uzorka ispod krivulje (sile) koristi za računanje elastičnosti (mm). Elastičnost je izražena na 50% vrijednosti očitane za tvrdoću. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja ($n=5$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

Morfološke karakteristike dobivenih hidrogel čestica ispitane su snimanjem čestica pomoću mikroskopa Leica DM1000 LED (Cambridge, Velika Britanija) uz odgovarajuće povećanje.

3.2.6.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica

Određivanje parametara boje uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan), pri čemu je dobivena reflektancija uzoraka u čitavom području vidljivog spektra te L^* , a^* i b^*

vrijednosti. Nelinearni odnosi za L^* , a^* i b^* vrijednosti imaju zadatak imitirati logaritamski odgovor ljudskog oka. Ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koji su poznati kao plavi, zeleni i crveni receptori. Sukladno tome, L^* vrijednost je osvjetljenje ili svjetlosna komponenta, koja ima vrijednosti u rasponu 1-100, dok su a^* (od zelene do crvene) i b^* (od plave do žute) dvije kromatske vrijednosti u rasponu od -120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007). Za potrebe analize, uzorci inkapsuliranih čestica dobivenih ionskim geliranjem preneseni su u posebne kivete za mjerenje boje promjera 30 mm, tako da se u potpunosti prekrije dno posudice i formira homogeni sloj uzorka. Područje mjerenja podešeno je na 400 do 700 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Kontrola mjerenja provedena je korištenjem računalne aplikacije SpectraMagic NX. Sva mjerenja izvršena su u SCI (eng. „*Specular Component Included*“) modu, koji predstavlja način mjerenja boje uzorka pri kojemu se uračunavaju sjene, tj. uzorak se prikazuje onako kako ga vidi ljudsko oko (Gökmen i Sügüt, 2007). Na temelju rezultata mjerenja, ukupna promjena boje (ΔE^*) u odnosu na referentni uzorak (čestice pripremljene samo s alginatom u sustavu nosača) izračunata je prema formuli:

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

Gdje je:

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

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

3.2.6.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

Udjel ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet u formiranim hidrogel česticama na bazi alginata određen je otapanjem 0,5 g čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici, do potpunog raspada hidrogel čestica. Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteu reagensa (opisano u poglavlju 3.2.1.), udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u reakciji s Arnou-ovim reagensom (opisano u poglavlju 3.2.2.), dok je određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode opisano u poglavljima 3.2.3. i 3.2.4. Učinkovitost inkapsulacije polifenola (%) i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta (%) izračunat je kao omjer udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, te antioksidacijskog kapaciteta, u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih spojeva u početnim otopinama sustava nosača pripremljenih u ekstraktu ružmarina i maslačka.

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

Otpuštanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih hidrogel čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola i udjela hidroksicimetnih kiselina te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH i ABTS metoda. Prema protokolu europske farmakopeje (European Pharmacopeia 7.0, 2010) pripremljene su simulirane gastrična i intestinalna otopina, a iste nisu sadržavale odgovarajuće enzime (pepsin i pankreatin). SGF je pripremljen s natrijevim kloridom i klorovodičnom kiselinom (pH=1,2), dok se za SIF koristio odgovarajući fosfatni pufer (pH=7,4). Čestice dobivene ionskim geliranjem izdvoje se iz ekstrakta u kojemu se čuvaju te se 0,6 g profiltriranih čestica prelije s 30 mL SGF-a temperature 37°C. Čestice se u SGF-u konstantno miješaju na magnetskoj miješalici pri 100 rpm-a i konstantnoj temperaturi od 37°C. U određenim vremenskim razmacima iz otopine s česticama izuzima se 2 mL tekućeg medija te se nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama dodaje po 2 mL svježeg SGF-a. Uzorkovanje se provodi u vremenskom periodu od 2 h. Nakon 2 h čestice se profiltriraju iz otopine SGF-a, posuše te preliju s 30 mL SIF-a prethodno zagrijanog na 37°C, uz konstantno miješanje (100 rpm) na istoj temperaturi. Postupak uzorkovanja provodi se na isti način kao i kod SGF-a prema

prethodno opisanom načinu, sve dok se čestice u potpunosti ne raspadnu. U dobivenim alikvotima od 2 mL određuje se udjel ukupnih polifenola (mg ekvivalenata galne kiseline/g čestica), hidrosicimetnih kiselina (mg kafeinske kiseline/g čestica) i antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/g čestica). Na temelju dobivenih rezultata određuje se profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ružmarina i maslačka iz ispitivanih sustava nosača na bazi alginata.

3.2.6.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom

Swelling metoda korištena je za praćenje omjera povećanja mase nastale usred bubrenja (vezanja vode) u liofiliziranim česticama. Masa uzorka (0,05 g liofiliziranih čestica) prelivena je s 20 mL destilirane vode uz miješanje na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Masa čestica je mjerena u određenim vremenskim intervalima (na početku, nakon 30 minuta, 1, 2, 4, 6 i 24 sata) na način da se čestice izdvoje iz tekućeg medija filtriranjem pomoću lijevka i filter papira, posuše staničevinom te se izvažu na analitičkoj vagi. Rezultati provedene *Swelling* metode izraženi su kao omjer početne mase čestica i mase čestica nakon vezanja vode u određenom vremenskom periodu (*Swelling ratio* - SR).

4. REZULTATI I RASPARAVA

U ovom istraživanju ispitao se potencijal inkapsulacije polifenolnih ekstrakata ružmarina i lista maslačka u sustave nosača na bazi alginata. Kao nosač za inkapsulaciju polifenolnih spojeva koristio se alginat te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke i zelenom kavom. Poseban naglasak stavio se na ispitivanje potencijala zelene kave kao materijala za inkapsulaciju koji do sada, u svrhu imobilizacije polifenolnih spojeva, nije korišten.

Ekstraktima ružmarina i maslačka ispitan je bioaktivni profil u vidu određivanja udjela ukupnih polifenola, hidrokscimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metoda, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3. Formiranim hidrogel česticama s inkapsuliranim polifenolima ružmarina i maslačka određen je udjel vode (slika 6), fizikalne (veličina čestica, parametri teksture) karakteristike čestica prikazane su u tablici 4, dok morfološke (izgled čestica) karakteristike čestica prezentirane na slikama 7 i 8. Vrijednosti za očitane parametre boje prikazane su u tablici 5. Učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina ekstrakata ružmarina i maslačka u različitim sustavima nosača na bazi alginata prikazana je na slici 9, dok je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta prikazana na slici 10. Profil otpuštanja ukupnih polifenola iz hidrogel čestica s imobiliziranim polifenolnim ekstraktima ružmarina i maslačka u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima prikazan je na slici 11, hidrokscimetnih kiselina na slici 12, dok je praćenje antioksidacijskog kapaciteta prikazano na slikama 13 (ABTS) i 14 (DPPH). Swelling metodom određen je omjer povećanja mase liofiliziranih čestica nakon vezanje vode, što je prikazano u tablici 6.

U poglavlju 3.1.1.1., 3.2.1., 3.2.2., 3.2.5. i 3.2.6.6. nalazi se opis oznaka koje su korištene na slikama i grafovima.

4.1. Karakterizacija polifenolnih ekstrakta ružmarina i maslačka

Tablica 3. Bioaktivni profil ekstrakta ružmarina i lista maslačka

Ekstrakt	UP [mg EGK/g]	HCA [mg KK/g]	ABTS [mmol Trolox/g]	DPPH [mmol Trolox/g]
Ružmarin	58,12 ± 0,91	69,46 ± 5,16	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,00
Maslačak	25,66 ± 0,15	18,85 ± 0,24	0,10 ± 0,00	0,15 ± 0,00

U tablici 3 nalazi se prikaz bioaktivnog profila ekstrakta ružmarina i lista maslačka, odnosno dobivene vrijednosti udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet ekstrakata određen primjenom ABTS i DPPH metode.

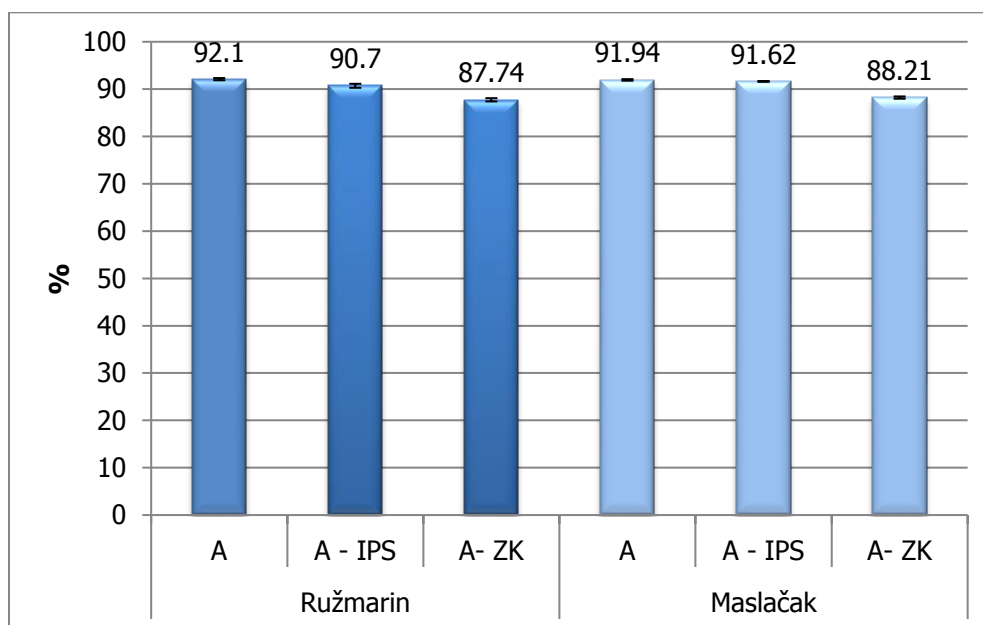
Udjel ukupnih polifenola za ekstrakt ružmarina iznosio je 58,12 mg EGK/g suhog uzorka, što je znatno manje od udjela dobivenog u istraživanju Erkan i suradnika (2008), koji su u ekstraktu lista ružmarina odredili udjel od 162 mg EGK/g uzorka. Mogući razlog razlike u rezultatima može se pripisati različitim ekstrakcijskim uvjetima budući da su Erkan i suradnici (2008) koristili metanol kao otapalo za ekstrakciju polifenola. Udjel hidroksicimetnih kiselina bio je 69,46 mg KK/g suhog uzorka. Nadalje određen je i antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista ružmarina koji je proveden pomoću ABTS i DPPH metode. Vrijednost dobivena za ABTS iznosila je 0,30 mmol Trolox/g suhog uzorka, dok je vrijednost za DPPH bila 0,29 mmol Trolox/g suhog uzorka, što je veće od vrijednosti dobivene kod Bubonja-Sonje i suradnika (2011) koji su u ekstraktu ružmarina odredili antioksidacijski kapacitet od 0,00031 mmol Trolox/g uzorka. Razlika u DPPH vrijednosti može se također pripisati različitim ekstrakcijskim uvjetima budući da su Bubonja-Sonje i suradnici (2011) koristili mješavinu vode, metanola i acetata za ekstrakciju polifenola, što se pokazalo manje učinkovito u odnosu na vodu koja se koristila kao otapalo u našem istraživanju.

Udjel ukupnih polifenola za ekstrakt maslačka iznosio je 25,66 mg EGK/g suhog uzorka, što je znatno manje od udjela navedenog kod Hu i Kitts (2003), koji su dobili vrijednost od 195,4 mg EGK/g uzorka za ekstrakt polifenola maslačka. No, ta se razlika može pripisati uporabi etanola za ekstrakciju polifenola kod Hu i Kitts (2003), koji je općenito poznat kao učinkovitije ekstrakcijsko otapalo za polifenole u odnosu na vodu. Vrijednost dobivena za hidroksicimetne kiseline iznosila je 18,85 mg KK/g suhog uzorka. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom iznosio je 0,10 mmol Trolox/g suhog uzorka, dok je za DPPH metodu dobivena

vrijednost od 0,15 mmol Trolox/g suhog uzorka, što je značajno veća vrijednost od one dobivene kod Wojdyło i suradnika (2007) koja je iznosila 0,002 mmol Trolox/g uzorka. Razlika u izmjerenoj vrijednosti za DPPH metodu može se pripisati korištenju vodene otopine metanola kod Wojdyło i suradnika (2007).

Analizom dobivenih vrijednosti vidljivo je da je udjel svih polifenolnih spojeva, kao i antioksidacijski kapacitet određen s obje metode, bio veći kod ružmarina u odnosu na maslačak.

4.2. Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka



Slika 6. Udjel vode (%) u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka

Slika 6. prikazuje udjel vode u formiranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktima ružmarina i maslačka te se analizom dobivenih rezultata može zaključiti da najveći udjel vode među ispitivanim sustavima sadrže čiste alginatne čestice, i u slučaju ružmarina i maslačka. Čiste alginatne čestice s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina sadrže neznatno veći udjel vode (92,10%) od čistih alginatnih čestica pripremljenih s ekstraktom maslačka (91,94%). Dodatak pomoćnih nosača (izolati proteina sirutke i zelena kava) u alginatni sustav rezultirao je smanjenjem udjela vode zbog povećanja udjela suhe tvari u sustavu, odnosno popunjavanja prostora između čestica (Belščak-Cvitanović i sur., 2016). Kod čestica s ružmarinom udjel vode

bio je veći u sustavu A-IPS (90,70%) u odnosu na A-ZK (87,74%). Isti trend vidljiv je i kod čestica s maslačkom, A-IPS (91,62%) > A-ZK (88,21%). Usporedbom rezultata za udjel vode u česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka, sustavi A-IPS i A-ZK s maslačkom sadrže veći udjel vode u odnosu na iste pripremljene s ružmarinom.

4.3. Fizikalne i morfološke karakteristike formiranih hidrogel čestica

Tablica 4. Veličina i parametri teksture hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka

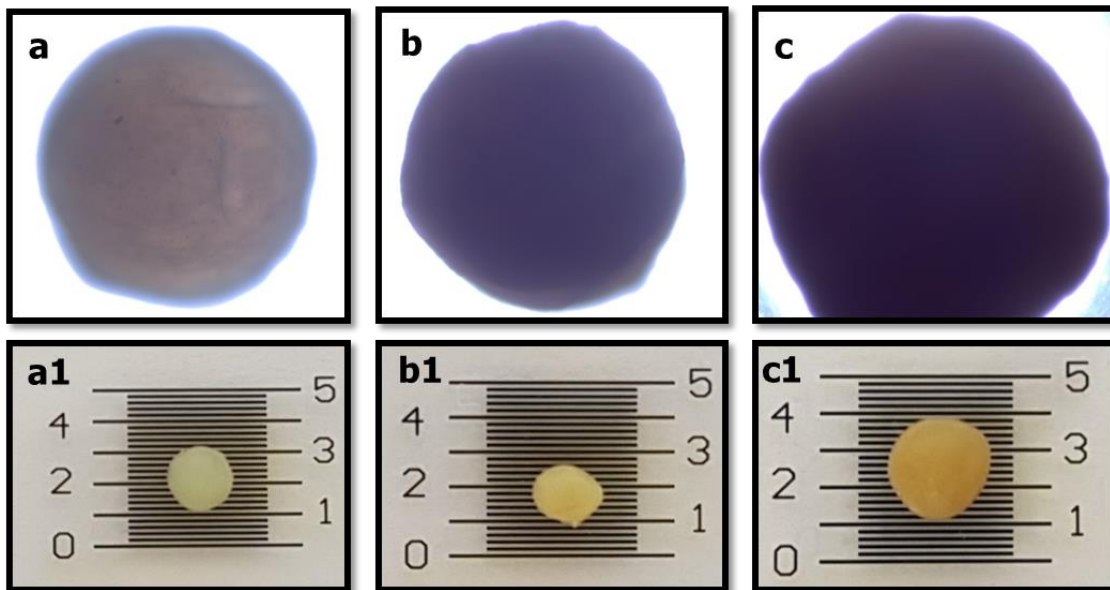
Noslač		Veličina (mm)	Tvrdoća (N)	Elastičnost (mm)
Ružmarin	A	1,88 ± 0,10	0,21 ± 0,01	0,35 ± 0,02
	A-IPS	1,60 ± 0,14	0,18 ± 0,01	0,32 ± 0,02
	A-ZK	2,47 ± 0,15	0,10 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Maslačak	A	1,94 ± 0,14	0,16 ± 0,00	0,28 ± 0,01
	A-IPS	1,89 ± 0,26	0,19 ± 0,01	0,30 ± 0,00
	A-ZK	2,60 ± 0,24	0,10 ± 0,01	0,24 ± 0,01

U tablici 4 prikazan je utjecaj različitih sustava nosača na fizikalne karakteristike (veličinu čestica, tvrdoću i elastičnost čestica) formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim polifenolima ružmarina i maslačka.

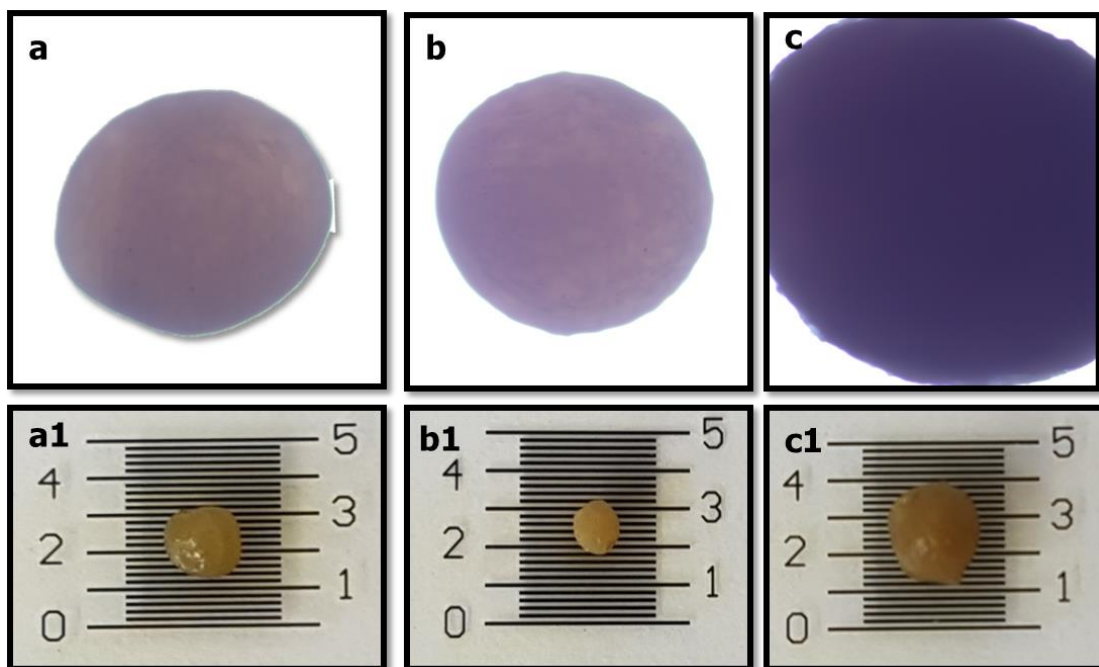
Općenito, čestice s inkapsuliranim polifenolima lista maslačka bile su veće u odnosu na iste pripremljene s ružmarinom, što ukazuje na utjecaj odabira biljne vrste za inkapsulaciju na samu veličinu dobivenih čestica. Kod obje biljne vrste, u odnosu na čestice s čistim alginatom (R-1,88 mm; M-1,94 mm), dodatak IPS-a u alginat rezultirao je formulacijom čestica manje veličine (R-1,60 mm; M-1,89 mm), dok je dodatak zelene kave rezultirao većim česticama (R-2,47 mm; M-2,60 mm).

Vrijednosti dobivene za tvrdoću i elastičnost pokazuju da u odnosu na čiste alginatne čestice, dodatak IPS-a i ZK u alginat daje čestice manje tvrdoće i manje elastičnosti, uz iznimku za sustav A-IPS pripremljen s maslačkom. Čestice veće tvrdoće bile su također i elastičnije. Sukladno tome, među svim promatranim sustavima najtvrđe čestice (0,21 N) i najelastičnije čestice (0,35 mm) bile su čestice s inkapsuliranim ružmarinom i pripremljene samo s alginatom (Tablica 4). Kod inkapsulata s maslačkom najtvrđe i najelastičnije hidrogel čestice bile su one s

IPS-om (0,19 N; 0,30 mm). Slični rezultati također su dobiveni i u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), gdje je dodatak IPS-a rezultirao manjim česticama, a također čestice veće tvrdoće bile su elastičnije. Osim što su bile manje, čestice s imobiliziranim ružmarinom bile su elastičnije u usporedbi s istima formuliranim s ekstraktom maslačka. Također, čestice koje su sadržavale veći udjel vode imale su veće vrijednosti tvrdoće.



Slika 7. Mikroskopska slika hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina (a-c) s pripadajućom slikom na kalibracijskoj pločici (a1-c1): a-alginat; b-alginat i izolati proteina sirutke; c-alginat i zelena kava



Slika 8. Mikroskopska slika hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka (a-c) s pripadajućom slikom na kalibracijskoj pločici (a1-c1): a-alginat; b-alginat i izolati proteina sirutke; c-alginat i zelena kava

Što se tiče morfoloških karakteristika ispitivanih hidrogel čestica, na slikama 7 i 8 vidljivo je da su čestice pripravljene samo s alginatom, za obje biljne vrste, imale najpravilniji oblik te pokazale visoku sferičnost. Dodatak dodatnih nosača u alginatni sustav rezultirao je promjenom morfoloških karakteristika i smanjenom sferičnosti. Ovakvi rezultati potvrđeni su i u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). U odnosu na čestice s alginatom, čestice s IPS-om i ZK bile su manje sferične te nepravilnijeg izgleda i površine čestica, no njihov morfološki izgled je i dalje bio zadovoljavajući. Između ta dva sustava, kod obje biljne vrste, implementacija ZK u alginat negativnije se odrazila na morfološke karakteristike dobivenih čestica, te su čestice s ZK imale najnepravilniji izgled i bile najveće, što se može pripisati manje homogenoj otopini nosača za inkapsulaciju i korištenju igle većeg promjera. Nije bilo većih razlika između morfoloških karakteristika kod čestica formuliranih s ekstraktima ružmarina i maslačka.

4.4. Određivanje parametara boje formiranih čestica

Tablica 5. Parametri boje hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka

Nosač		L^*	a^*	b^*	ΔE^*
Ružmarin	A	54,44 ± 0,19	2,74 ± 0,05	24,10 ± 0,42	-
	A-IPS	49,42 ± 0,10	4,27 ± 0,05	24,31 ± 0,13	2,54 ± 0,12
	AZK	38,67 ± 0,13	6,33 ± 0,04	20,88 ± 0,05	13,69 ± 0,15
Maslačak	A	35,27 ± 0,04	5,90 ± 0,06	19,36 ± 0,29	-
	A-IPS	35,06 ± 0,06	5,97 ± 0,05	20,55 ± 0,14	1,21 ± 0,15
	A-ZK	33,05 ± 0,16	6,46 ± 0,08	19,15 ± 0,02	2,30 ± 0,17

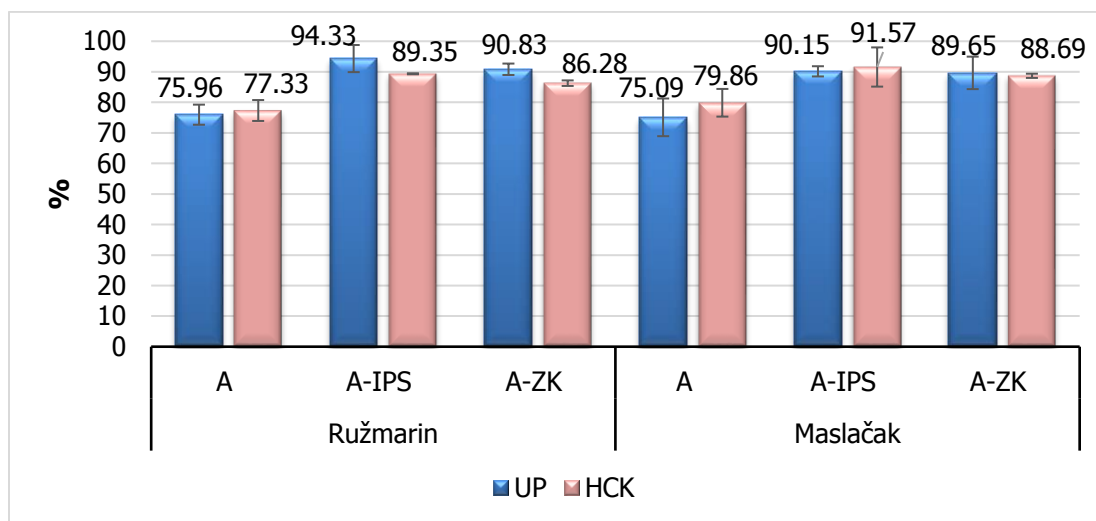
U tablici 5 nalaze se parametri svjetline (L^*), parametri boje ispitivanih uzoraka za crveno (a^*), parametri boje ispitivanog uzorka za žuto (b^*) i izračunata ukupna promjena boje (ΔE^*). ΔE^* izračunata je u česticama s inkapsuliranim ekstraktima ružmarina i maslačka pripremljenim s alginatom u kombinaciji s IPS i ZK u odnosu na čestice pripremljene s čistim alginatom, prema formuli u poglavlju 3.2.6.3. Isti trend vidljiv je za vrijednosti svjetline kod obje biljne vrste, gdje su uzorci napravljeni samo s čistim alginatom bili najsvjetliji, a dodatak IPS-a i ZK u sustav alginatnog nosača rezultirao je smanjenim vrijednostima za svjetlinu, odnosno uzorci A-IPS i A-ZK bili su tamniji. Među ispitanim uzorcima, čestice pripremljene s ZK bile su najtamnije. Vrijednosti za svjetlinu (L^*) za mikroinkapsulirane sustave s ružmarinom bile su sljedeće: 54,44 (A) > 49,42 (A-IPS) > 38,67 (A-ZK), dok su za uzorke s imobiliziranim maslačak iznosile: 35,27 (A) > 35,06 (A-IPS) > 33,05 (A-ZK) (Tablica 4). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su hidrogel čestice s ekstraktom ružmarina bile znatno svijetlije u odnosu na iste pripremljene s maslačkom, što je vidljivo i na slikama 7 i 8. Kod uzoraka s inkapsuliranim polifenolima maslačka primijećena je manja razlika u svijetlini, dok je kod alginatnih uzoraka s ružmarinom ta razlika bila izraženija.

Veće vrijednosti za parametar boje a^* , koji upućuje na izraženije crveno obojenje, imale su čestice s inkapsuliranim polifenolima maslačka. Vidljivo je da su i kod čestica s ružmarinom i maslačkom vrijednosti za a^* bile najveće kod alginatnog sustava sa zelenom kavom (R – 6,33; M – 6,46). Vrijednosti za parametar boje b^* , koje upućuju na izraženije žuto obojenje, među svim analiziranim uzorcima bile su veće kod mikroinkapsuliranih sustava s ružmarinom. U ovom

slučaju, najmanju b^* vrijednost kod obje biljne vrste imali su uzorci s zelenom kavom (R - 20,88; M - 19,15).

Trend svjetline prati i ukupna promjena boje (ΔE^*), gdje su čestice pripravljene s ružmarinom značajnije promijenile boju od čestica pripremljenih s maslačkom (Tablica 5). Najveća promjena boje detektirana je za uzorak A-ZK s ekstraktom ružmarina ($\Delta E^* = 13,69$).

4.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta



Slika 9. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) i hidroksicimetnih kiselina (HCK) u hidrogel česticama s imobiliziranim ekstraktom ružmarina i maslačka

Na slici 9 prikazana je inkapsulacijska učinkovitost (%) ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka, pripremljenim ionskim geliranjem u različitim sustavima nosača na bazi alginata.

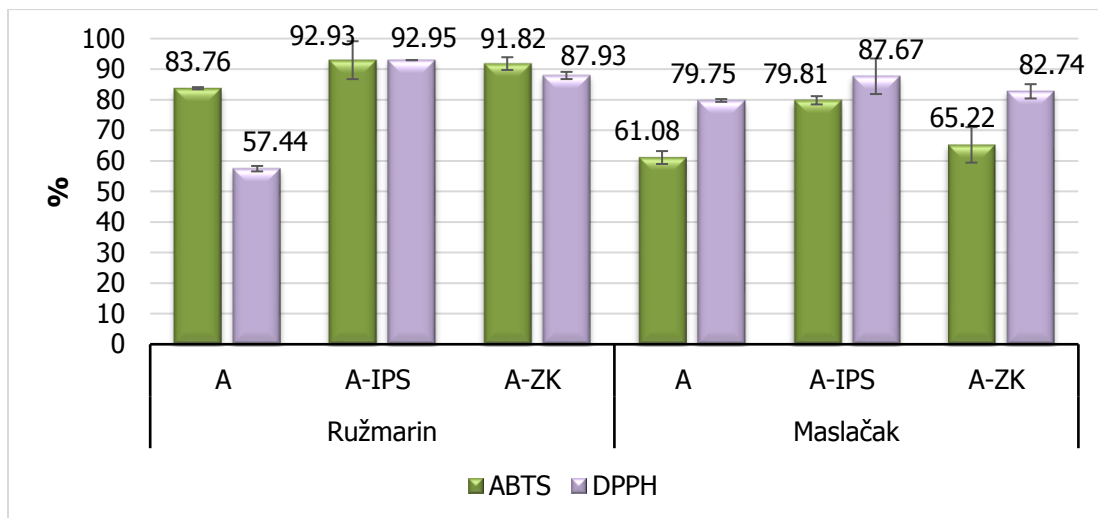
Kod obje biljne vrste, najnižu inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola imao je sustav pripremljen s čistim alginatom, dok je dodatak pomoćnih materijala u alginatni sustav, poput izolata proteina sirutke i zelene kave, omogućio zadržavanje većeg udjela ukupnih polifenola unutar mreže alginatnog gela i time znatno poboljšao stupanj inkapsulacije istih. Dodatak IPS-a u polisaharidni omotač s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina rezultirao je najvećim stupnjem inkapsulacije ukupnih polifenola (94,33%), praćen sustavom A-ZK (90,83%). Kod sustava s imobiliziranim polifenolima maslačka primijećen je isti obrazac za

inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola, prema sljedećem redosljedu: 75,09% (A) < 89,65% (A-ZK) < 90,15% (A-IPS). Iako se do sada zelena kava nije koristila za „jačanje“ nosača za inkapsulaciju, dobiveni rezultati ukazuju na visok potencijal zelene kave kao dodatnog materijala u sustavu nosača za inkapsulaciju polifenolnih spojeva.

Povećanje inkapsulacijske učinkovitosti dodatkom pomoćnih materijala u sustave nosača za inkapsulaciju primijećen je i u drugim istraživanjima. U istraživanju Bušić i suradnika (2016), dodatak zeina (Z), proteina kukuruza, u alginatni sustav poboljšao je inkapsulacijsku učinkovitost polifenola medicinske gljive *Ganoderma lucidum* za 1,52%. Prilikom dodatka anionskog alginata u poli(D,L-laktid-*co*-glikolid) inkapsulacijska učinkovitost rezervatola povećala se s 8 na 23% (Sanna i sur., 2012). Također, utjecaj „jačanja“ alginatnog nosača ispitan je i u radu López Córdoba i suradnika (2013), gdje je dodatak škroba u alginatni sustav povećao inkapsulacijsku učinkovitost ekstrakta polifenola yerbe mate s 55 na 65%. Poboljšanje inkapsulacije β -karotena i polifenola cvijeta maslačka dodatkom izolata proteina sirutke u alginat određeno u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2016).

Učinkovitost inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina u hidrogel česticama s imobiliziranim polifenolima ružmarina i maslačka prikazana je na slici 9. Kao i kod inkapsulacije ukupnih polifenola, isti trend prati i zadržavanje hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim hidrogel česticama. „Jačanje“ alginata s IPS i ZK, kod obje biljne vrste, doprinijelo je učinkovitijoj inkapsulaciji hidroksicimetnih kiselina unutar formiranih čestica. Za razliku od mikroinkapsuliranih sustava s ružmarinom koji su pokazali veći afinitet prema ukupnim polifenolima, sustavi s inkapsuliranim ekstraktom maslačka imali su veći stupanj zadržavanja hidroksicimetnih kiselina. Sustav A-IPS pokazao je najveći afinitet prema hidroksicimetnim kiselinama (R – 89,35%; M – 91,57%). Visoka učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina u slučaju kada je korišten IPS može se pripisati činjenici da proteini snažno reagiraju s polifenolnim spojevima vezanjem vodika i preko hidrofobnih interakcija (Li i sur., 2009). Zahvaljujući visokom afinitetu polifenola prema proteinima i interakcijama koje se mogu pojaviti između proteina i polisaharida moguće je stvaranje kompleksa protein-polifenoli i protein-polisaharid, što na kraju može rezultirati uspješnom kemijskom ugradnjom polifenola u takve sustave nosača (Bušić i sur., 2016; Belščak-Cvitanović i sur., 2016). Nadalje, stupanj inkapsulacije bio je visok i kada se alginat kombinirao s ZK (R – 86,28%; M – 88,69%). Također, vidljiv je i obrnuto proporcionalan odnos između veličine hidrogel čestica i učinkovitosti

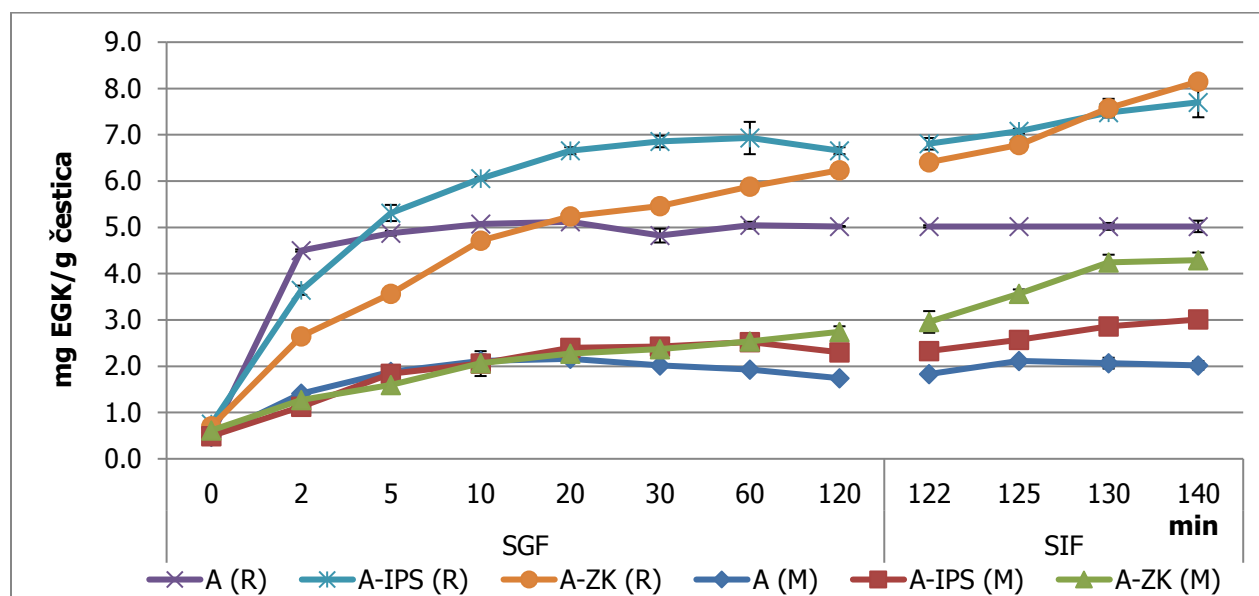
inkapsulacije polifenola, budući da su najmanje čestice (one formirane s A-IPS) pokazale najveću sposobnost inkapsulacije polifenolnih spojeva.



Slika 10. Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom u hidrogel česticama s imobiliziranim ekstraktom ružmarina i maslačka

Slika 10 prikazuje učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode. Kao i kod inkapsulacije ukupnih polifenola i hidrosicimetnih kiselina vidljivo je da binarni sustavi nosača (A-IPS i A-ZK) imaju veću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta kod obje biljne vrste. Isto tako, uzorci s inkapsuliranim polifenolima ružmarina imali su veću sposobnost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom obje metode, uz iznimku uzorka s čistim alginatom kod DPPH metode, gdje se taj sustav pokazao učinkovitijim u odnosu na isti uzorak s ružmarinom. Najveću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom imao je sustav A-IPS (R – 92,93%; M – 79,81%), praćen sustavom A-ZK (R – 91,82%; M – 65,22%). Primjenom DPPH metode tendencija zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta bila je ista: A-IPS (R – 92,95%; M – 87,67%) > A-ZK (R – 87,93%; M – 82,74%) > A (R – 57,44%; M – 79,75%).

4.6. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijski kapacitet iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka

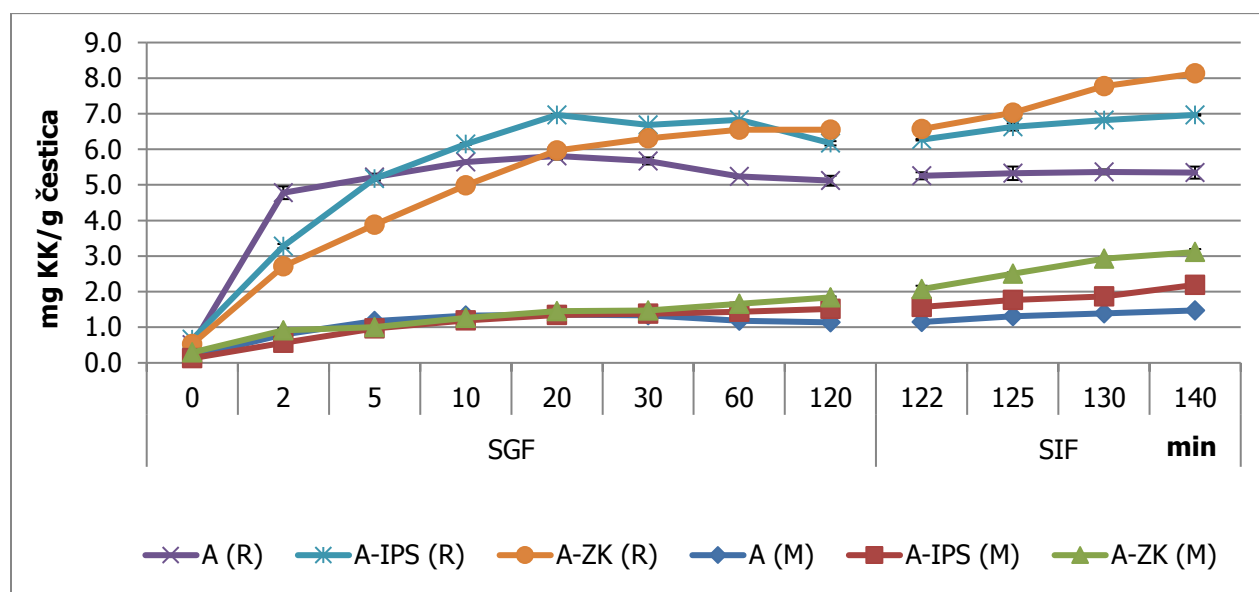


Slika 11. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg EGK/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka u SGF i SIF fluidima

Praćenje otpuštanja ukupnih polifenola iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka prikazan je na slici 11.

Usporedbom ispitivanih hidrogel čestica primijećeno je da dodatak dodatnih materijala (IPS i ZK) u sustave nosača za inkapsulaciju usporava otpuštanje ukupnih polifenola iz formiranih čestica, što opravdava dodatak takvih materijala u alginatni gel. Produljeno otpuštanje aktivnih susptanci, diltiazem hidroklorida (Gal i Nussinovitch, 2007), insekticida klorpirifosa (Roy i sur., 2009) i fungicida tirama (Singh i sur., 2009) nakon dodatka škroba u alginatni gel primjećeno je i u drugim istraživanjima. U slučaju čistih alginatnih hidrogel čestica s ružmarinom, otpuštanje ukupnih polifenola bilo je naglo u prve 2 min, a zatim se nastavilo postepeno otpuštati do 20 min u SGF-u, nakon čega je postignuto ravnotežno stanje. Kod čistih alginatnih čestica s maslačkom otpuštanje polifenola iz čestica odvijalo se postepeno do 20 min u SGF-u, nakon čega su se polifenoli prestali otpuštati iz čestica, a nakon prebacivanja u intestinalni fluid došlo je opet do neznatnog otpuštanja ukupnih polifenola u 125. minuti. Isti profil otpuštanja ukupnih polifenola *Ganoderme lucidum* iz alginatnih čestica zamijećen je i kod Bušić i suradnika (2016). Dodatak IPS-a značajno je poboljšao profil otpuštanja polifenola iz

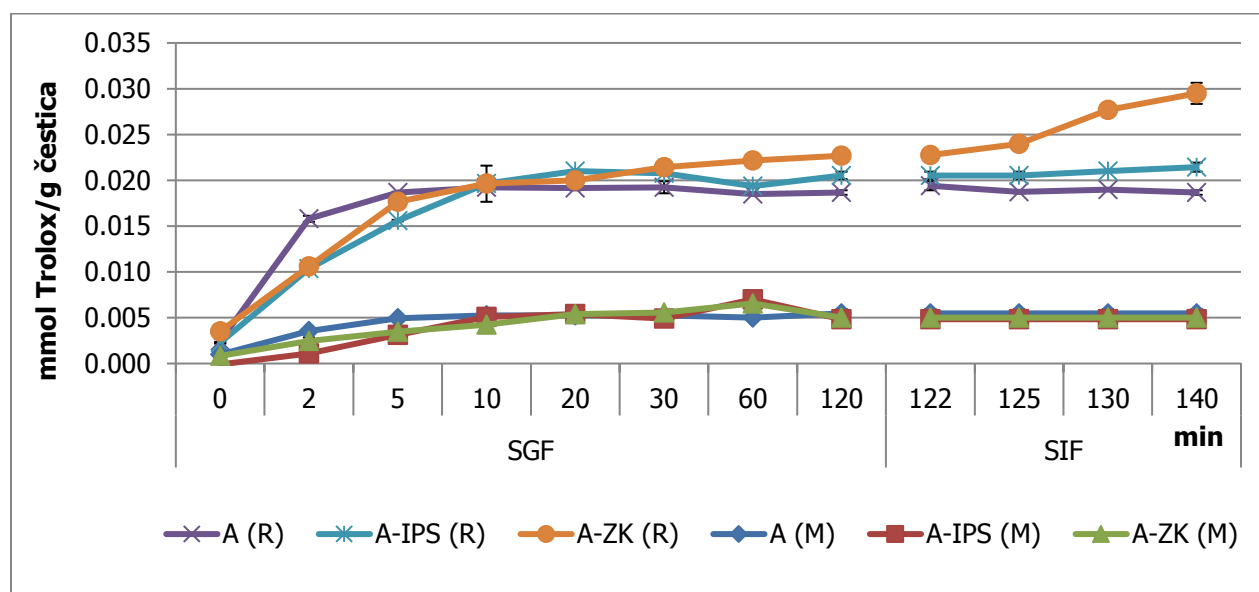
čestica, kod sustava formuliranih s ružmarinom i maslačkom, gdje je bilo vidljivo kontinuirano otpuštanje polifenola do 60. minute u SGF-u, uz nastavak otpuštanja u SIF-u do 140. minute. No najbolji profil otpuštanja, kod obje biljne vrste, pokazao je sustav A-ZK, gdje je otpuštanje ukupnih polifenola bilo kontinuirano kroz svih 140 minuta s udjelom od 8,150 mg EKG/g čestica (za sustav s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina) i 4,292 mg EKG/g čestica (za sustav s inkapsuliranim ekstraktom maslačka). Dobiveni rezultati ukazuju da je dodatak zelene kave u alginatni nosač smanjio poroznost alginatnog gela te omogućio produženo otpuštanje polifenola iz čestica, te se time istaknuo kao najučinkovitiji sustav u zadržavanju ukupnih polifenola iz čestica u gastrointestinalnim uvjetima.



Slika 12. Profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (mg KK/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka u SGF i SIF fluidima

Slika 12 prikazuje otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz formiranih hidrogel čestica s imobiliziranim ekstraktima ružmarina i maslačka. Kao i kod otpuštanja ukupnih polifenola iz ispitivanih čestica, i ovdje je vidljivo da se hidroksicimetne kiseline najbrže otpuštaju iz čistih alginatnih sustava, dok implementacija IPS i ZK u alginatni gel dovodi do produženog otpuštanja istih. U čistom alginatnom gelu s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina je sličan u oba sustava, gdje je zabilježeno postepeno otpuštanje do 20 min u gastričnim uvjetima te postizanje ravnotežnog stanja do 140 min, uz neznatne fluktuacije (lagano otpuštanje iz čestica s maslačkom nakon prebacivanja u SIF). U

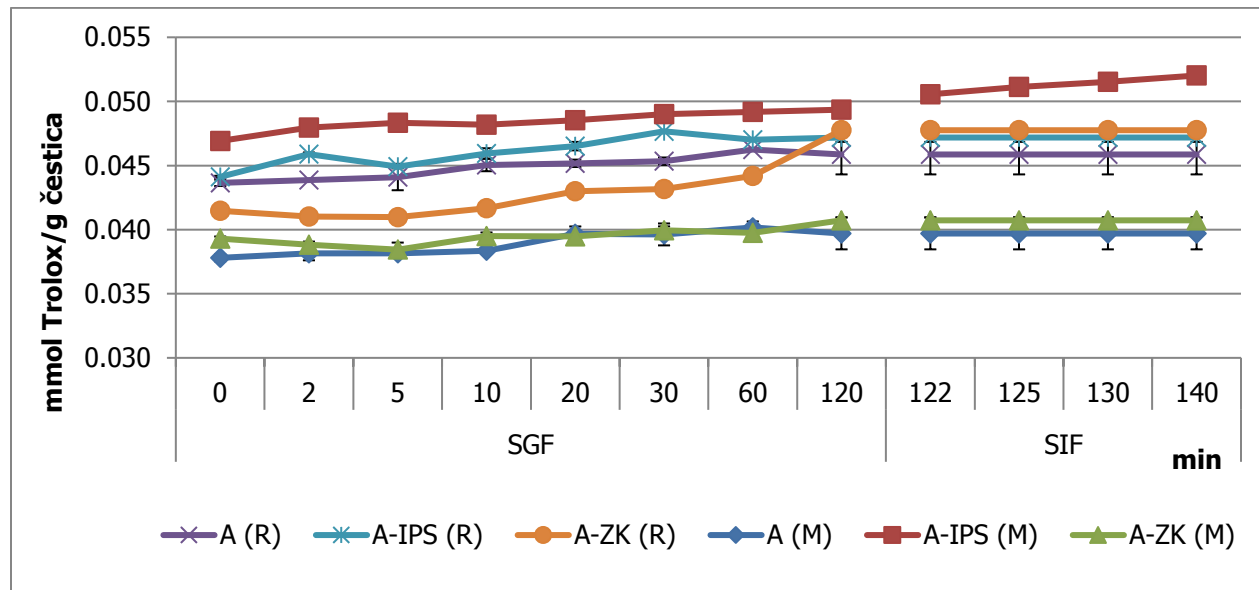
„pojačanom“ sustavu s izolatima proteina sirutke pripremljenim s ružmarinom otpuštanje hidroksicimetnih kiselina odvijalo se do prvih 20 min u SGF-u te se nastavilo postepeno otpuštati u SIF-u do 140. minute S druge strane, u sustavu A-IPS s inkapsuliranim ekstraktom maslačka otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz čestica odvijalo se postepeno u SGF-u i SIF-u kroz svih 140 min (R- do 140 min 6,966 mg KK/g čestica; M- do 140 min 2,191 mg KK/g čestica). Kao i kod polifenola, najbolji profil otpuštanja, za obje biljne vrste, pokazale su čestice pripremljene s zelenom kavom gdje je otpuštanje ispitivanih spojeva iz čestica bilo kontinuirano u gastričnom i u intestinalnom fluid, tijekom 140 minuta, do 8,132 mg KK/g čestica (R) te do 3,113 mg KK/g čestica (M).



Slika 13. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox/g čestica) primjenom ABTS metode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka u SGF i SIF fluidima

Kod ABTS metode profil otpuštanja je vrlo sličan za sustave A i A-IPS pripremljene s ružmarinom, gdje se veći dio antioksidacijskog kapaciteta polifenola otpustio u 5. i 20. minuti nakon čega je otpuštanje prešlo u ravnotežno stanje. Sustav A-ZK s ružmarinom, i ovdje pokazuje najbolji profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta, pri čemu dolazi do kontinuiranog otpuštanja u SGF-u i SIF-u, sve do 140 minute (0,029 mmol Trolox-a/g čestica). Kod inkapsulata s maslačkom, sustav A doseže svoj maksimum već u 5. minuti, i ostaje u ravnotežnom stanju kroz cijelo vrijeme analize. Sustavi A-IPS i A-ZK dostižu maksimalno

otpuštanje u 60. minuti (s tim da kod sustava s inkapsuliranim maslačkom za A-IPS ravnotežno stanje se javlja od 10. do 30. minute, pa opet kratko raste u 60. min), nakon čega otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica prestaje.



Slika 14. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox/g čestica) primjenom DPPH metode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina i maslačka u SGF i SIF fluidima

Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom odvija se vrlo brzo kod gotovo svih sustava uz vrlo brzo postizanje ravnotežnog stanja, uz poneke fluktuacije. Slični rezultati dobiveni su i kod Bušić i suradnika (2016). Iznimku u profilu otpuštanja čine sustavi A-ZK (R) i A-IPS (M). Kod sustava A-ZK (R), otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta je malo izraženije te je uočen rast do 120. minute u gastričnom fluidu, nakon čega dolazi do ravnotežnog stanja u intestinalnom fluidu. Sustav A-IPS (M) pokazuje lagani porast otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH metode kroz svih 140 min.

4.7. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode

Tablica 6. Omjer povećanja mase nastale uslijed bubrenja (vezanja vode) u liofiliziranim česticama

Nosáč		SR _{30min}	SR _{1h}	SR _{2h}	SR _{4h}	SR _{6h}	SR _{24h}
Ružmarin	A	3,575±0,026	3,708±0,038	3,844±0,058	4,189±0,027	4,411±0,043	4,680±0,059
	A-IPS	2,869±0,013	2,911±0,032	3,187±0,025	3,465±0,053	3,227±0,088	3,928±0,012
	A-ZK	3,403±0,033	3,8063±0,041	3,967 ± 0,00	3,962±0,124	3,979±0,064	4,081±0,497
Maslačak	A	2,385±0,015	2,555±0,004	2,570±0,019	2,648±0,010	2,675±0,014	2,888±0,003
	A-IPS	3,039±0,010	3,081±0,010	3,249±0,016	3,134±0,005	3,146±0,008	3,420±0,021
	A-ZK	5,051±0,144	5,192±0,003	5,465±0,083	5,162±0,190	4,524±0,159	3,439±0,216

SR* - Swelling ratio, omjer bubrenja mase ostavi

Omjer povećanja mase liofiliziranih čestica uslijed bubrenja (vezanja vode) prikazan je u tablici 6, pri čemu je kod svih promatranih sustava, uslijed poroznosti alginatnog gela, vidljivo povećanje omjera mase tijekom vremena, uz pojedine fluktuacije.

Analizom rezultata vidljivo je da je kod sustava nosača s ekstraktom ružmarina došlo do postupnog povećanja mase tijekom 24 h, uz sitna odstupanja. Omjer bubrenja mase kod svih čestica bio je najveći nakon 24 h. Najveće povećanje mase tijekom vremena imale su čestice s čistim alginatom (SR_{24h} = 4,680) potom čestice A-ZK (SR_{24h} = 4,081), a najmanje povećanje mase imale su čestice A-IPS (SR_{24h} = 3,928).

Kod alginatnih čestica s imobiliziranim ekstraktom maslačka zabilježeno je postupno povećanje mase tijekom vremena kod mikroinkapsuliranih sustava A i A-IPS (uz iznimku za sustav A-IPS - SR_{4h} i SR_{6h}). Kod sustava A-ZK, omjer bubrenja mase se povećavao do 2h mjerenja, a zatim se, uslijed raspada čestica u vodenom mediju, masa čestica počela smanjivati sve do 24 h (sa SR_{2h} = 5,465 do SR_{24h} = 3,439), što ukazuje na činjenicu da je ovdje došlo do prestanka difuzije vode u čestice, kao kod drugih sustava, već do pojave nekih drugih mehanizama koji su rezultirali degradacijom alginatnog gela. Unatoč smanjenju mase kod sustava A-ZK, kod ovog sustava zabilježen je najveći omjer bubrenja mase nakon 24 h (SR_{24h} = 3,439), dok je najmanji omjer bubrenja mase imao sustav A (SR_{24h} = 2,888).

Kod mikroinkapsuliranih sustava primijećen je proporcionalan odnos između veličine čestica i omjera povećanja mase uslijed vezanja vode, budući da su kod čestica s inkapsuliranim

ekstraktom ružmarina najmanje čestice imale najmanji afinitet vezanja vode (A-IPS), a obrnuto, ali isto proporcionalno, kod čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačkom najveće čestice imale su najveći kapacitet bubrenja vode (A-ZK).

5. ZAKLJUČCI

1. Udjel ukupnih polifenola, hidrokscimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet određen primjenom ABTS i DPPH metoda bio je veći u ekstraktu ružmarina u odnosu na ekstrakt lista maslačka.
2. Dodatak izolata proteina sirutke u alginat rezultirao je smanjenjem veličine hidrogel čestica obje biljne vrste, dok je dodatak zelene kave uzrokovao povećanje veličine čestica u odnosu na čestice pripravljene s alginatom.
3. Čestice obje biljne vrste pripravljene samo s alginatom imale su najpravilniji sferični oblik, dok su čestice s izolatima proteina sirutke bile manje sferične te nepravilnijeg izgleda i površine čestica, no, njihov morfološki izgled i dalje je bio zadovoljavajući. Dodatak zelene kave u alginatni nosač rezultirao je najlošijim morfološkim karakteristikama dobivenih hidrogel čestica.
4. Dodatak izolata proteina sirutke i zelene kave rezultirao je tamnjenjem kod hidrogel čestica, a kod obje biljne vrste najveću promjenu boje uzrokovao je dodatak zelene kave. Promjena boje bila je izraženija kod uzoraka s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u odnosu na čestice s inkapsuliranim ekstraktom maslačka.
5. Dodatak izolata proteina sirutke i zelene kave u alginatni gel rezultirao je povećanjem inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola, hidrokscimetnih kiselina te povećanjem stupnja zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, pri čemu se dodatak izolata proteina sirutke pokazao učinkovitijim.
6. Uočen je obrnuto proporcionalan odnos između veličine hidrogel čestica formiranih dodatkom izolata proteina sirutke i učinkovitosti inkapsulacije polifenola ružmarin i maslačka, budući da su najmanje čestice pokazale najveću sposobnost inkapsulacije polifenolnih spojeva.
7. Binarni sustavi s izolatima proteina sirutke i zelenom kavom imali su sporiji profil otpuštanja ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina te antioksidacijskog kapaciteta u usporedbi s čistim alginatom. Kod obje biljne vrste najsporiji profil otpuštanja svih ispitivanih parametara imao je sustav pripravljene sa zelenom kavom.
8. Zelena kava, kao do sada neispitani materijal za inkapsulaciju, pokazala je veliki potencijal za inkapsulaciju polifenolnih spojeva, a svojim sastavom dodatno je obogatila bioaktivni profil dobivenih čestica.

6. LITERATURA:

Aditya N. P., Espinosa Y. G., Norton I. T. (2017) Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. *Biotechnology Advances* **35(4)**: 450 - 457.

Aguiar J., Costa R., Rocha F., Estevinho B. N., Santos L. (2017) Design of microparticles containing natural antioxidants: Preparation, characterization and controlled release studies. *Powder Technology* **313**: 287 - 292.

Ahmad I., Aqil F., Mohammad O. (2006) Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants Into Drugs, 1. izd., John Wiley & Sons, Inc. str. 1

Anonymous 1 (2015)

<https://www.google.hr/search?q=ru%C5%BEmarin&source=Inms&tbm=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwjEo9PoyvTTAhWSLVAKHXjAD6YQ_AUIBigB&biw=1366&bih=648#imgrc=jCC6-QkOtbSLYM> Pristupljeno 16. svibnja 2017.

Anonymous 2 (2016)

<https://www.google.hr/search?q=ru%C5%BEmarin&source=Inms&tbm=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwjEo9PoyvTTAhWSLVAKHXjAD6YQ_AUIBigB&biw=1366&bih=648#tbm=isch&q=masla%C4%8Dak&imgrc=XQFu3BbobUBJdM> Pristupljeno 16. svibnja 2017.

Anonymous 3 (2003)

<https://www.google.hr/search?q=ru%C5%BEmarin&source=Inms&tbm=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwjEo9PoyvTTAhWSLVAKHXjAD6YQ_AUIBigB&biw=1366&bih=648#q=ionic+gelation&tbm=isch&tbs=rimg:CdG770eJW3VCIjj2eXrlicrXQZZMvKyPzMmbbyfzZi2a_1GLnuSqyqqyoEwZMxNxiwUZF8z497mvZ2oVALu1agchN8yoSCfZ5euWJytdBEZCW2RLhy_15TKhIJlky8rI_1MyZsR15A7NC5T-bIqEglJ_1NmLzr8YhFVzYVSZcgeFyoSCee5KrKqrKgTEZyrAA9bE_1ISKhIJBkzE3GLBRkURF4GfEA_D5GoUqEgnzPj3ua9nahRGMmTit-BjVVCoSCUCW7VqByE3zESPavqslrVUV&imgrc=QJbtWoHITfNg9M> Pristupljeno 17. svibnja 2017.

- Arranz E., Jaime L., García-Risco M. R., Fornari T., Reglero G., Santoyo S. (2015) Anti-inflammatory activity of rosemary extracts obtained by supercritical carbon dioxide enriched in carnosic acid and carnosol. *International Journal of Food Science & Technology* **50(3)**: 674 - 681.
- Arranz E., Guri A., Fornari T., Mendiola J. A., Reglero G., Corredig M. (2017) In vitro uptake and immune functionality of digested Rosemary extract delivered through food grade vehicles. *Food Research International* **97**: 71 - 77.
- Arslan D., Musa Özcan M. (2008) Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management* **49(5)**: 1258 - 1264.
- Bai N., He K., Roller M., Lai C. S., Shao X., Pan M. H., Ho C.T. (2010) Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58(9)**: 5363 - 5367.
- 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 Hydrocolloids* **57**: 139 - 152.
- Ben Jemia M., Tundis R., Maggioc A., Rossellic S., Senatore F., Menichinib F., Brunoc M., Kchouka M. E., Loizzob M. R. (2013) NMR-based quantification of rosmarinic and carnosic acids, GC-MS profile and bioactivity relevant to neurodegenerative disorders of *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. *Journal of functional foods* **5**: 1873 - 1882.
- Bubonja-Sonje M., Giacometti J., Abram M. (2011) Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry* **127**: 1821 - 1827.
- Borrás-Linares I., Stojanović Z., Quirantes-Piné R., Arráez-Román D., Švarc-Gajić J., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. (2014) *Rosmarinus Officinalis* Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *International journal of molecular sciences* **15**: 20585 - 20606.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **28**: 25-30.

Bunghez F., Rotar A. M., Vodnar D. N., Cătunescu G. M., Socaciu C. (2015) Comparative evaluation of phenolics' profile and recovery in spray dried powders obtained from rosemary and oregano extracts in relation to their antibacterial activity *in vitro*. *Romanian Biotechnological Letters* **21**.

Bunghez F., Rotar M. A., Pop R. M., Romanciuc F., Csernatoni F., Fetea F., Diaconeasa Z., Socaciu C. (2015) Comparative phenolic fingerprint and LC-ESI+QTOF-MS composition of oregano and rosemary hydrophilic extracts in relation to their antibacterial effect. *Bulletin UASVM Food Science and Technology* **72(1)**: 2344 - 5300.

Bušić A., Belščak-Cvitanović A., Wang Y., Vojvodić A., Karlović S., Špoljarić I., Mršić G., Veršec P., Vučilovski J., Komes D. (2016) Application of whey protein isolates and zein for the formulation of alginate-based delivery systems encapsulating *Ganoderma lucidum* polyphenols. *Food Hydrocolloids* **57**: 139 - 152.

Casanova F., Estevinho B. N., Santos L. (2016) Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. *Powder Technology* **297**: 44 - 49.

Chkhikvishvili I. D., Kharebava G. I. (2001) Chicoric and chlorogenic acid in plant species from Georgia. *Applied Biochemistry and Microbiology* **37(2)**: 188 - 191.

Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**: 7313 - 7352.

Del Pilar Sánchez-Camargo A., Valdés A., Sullini G., García-Cañas V., Cifuentes A., Ibáñez E., Herrero M. (2014) Two-step sequential supercritical fluid extracts from rosemary with enhanced anti-proliferative activity. *Journal of functional foods* **11**: 293 - 303.

Draget K. I., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. (2005) Alginates from Algae. U: Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry, 1. izd., Steinbüchel A., Rhee S. K., ur., John Wiley & Sons, Inc. str. 1 - 30.

Embuscado M. E. (2015) Spices and herbs: natural sources of antioxidants - a mini review. *Journal of Functional Foods* **18**: 811 - 819.

Erhatic R., Vukobratović M., Dudaš S., Mužić M. (2014) Kemijske karakteristike populacija maslačka s križevačkog i riječkog područja. *Agronomski glasnik* **76**: 127 - 136.

Erkan N., Ayranci G., Erol Ayranci E. (2007) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* **110**: 76 - 82.

Fang Z. (2012) Spray Drying, Freeze Drying and Related Processes for Food Ingredient and Nutraceutical Encapsulation. U: Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals, 239 izd., Garti N., McClements D. J., ur., Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing. str. 73 - 109.

Gal A., Nussinovitch A. (2007) Hydrocolloid carriers with filler inclusion for diltiazem hydrochloride release. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96(1)**: 168 - 178.

Guan Y., Chu Q., Fu L., Ye J. (2005) Determination of antioxidants in cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* **1074**: 201 - 204.

Han H., He W., Wang W., Gao B. (2011) Inhibitory effect of aqueous dandelion extract on HIV-1 replication and reverse transcriptase activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **11**: 112.

Hu C., Kitts D.D. (2003) Dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extract suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide and prevents lipid oxidation in vitro. *Phytomedicine* **12**: 588 - 597.

Hudec J., Burdovaä M. R., Kobida L., Komora L., Macho V., Koga, G., Turianica I., Kochanovaä R., Ložýek O., Habaän M., Chlebo A. P. (2007) Antioxidant capacity changes and phenolic profile of echinacea purpurea, nettle (*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after

application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 5689 - 5696.

Ivanov I. G. (2014) Polyphenols content and antioxidant activities of *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (dandelion) leaves. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **6(4)**: 889 - 893.

Jeon H. J., Kang H. J., Jung H., Kang Y. S., Lim C. M., Kim Y. M. (2008) Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *Journal of Ethnopharmacology* **115**: 82 - 88.

Johnson J. J. (2011) Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters* **305**: 1 - 7.

Karakurum Göskel B., Coskun O., Ucler S., Karatas M., Ozge A., Ozkan S. (2014) Use of complementary and alternative medicine by a sample of Turkish primary headache patients. *Revista de Agricultura* **26(1)**: 1 - 7.

Kaur K., Bani S. (2011) Chicoric acid regulates behavior and biochemical alterations induced by chronic stress in experimental Swiss albino mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **99**: 342 - 348.

Koh Y. J., Cha D. S., Ko J. S., Park H. J., Choi H. E. (2010) Anti-inflammatory effects of *Taraxacum officinale* leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW cells. *Journal of Medicinal Food* **13(4)**: 870 - 878.

Lans C., Turner N., Khan T., Brauer G., Boepple W. (2007) Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **3**: 1 - 22.

Leea K. Y., Mooney D. J. (2011) Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **37**: 106 - 126.

Lesinger I. (1999) Ljekovitost Povrća, Voća i Začina, 1. izd., Volosko. str. 158

Li Y., Lim L. T., Kakuda Y. (2009) Electrospun zein fibers as carriers to stabilize (-)-epigallocatechin gallate. *Journal of Food Science* **74(3)**: 233 - 240.

López Córdoba A., Deladino L., Martino M. (2013) Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers* **95**: 315 - 323.

Lorenzi H., de Abreu Matos F. J. (2006) *Rosmarinus officinalis* L. U: Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas, 1. izd., Instituto Plantarum de Estudos da Flora, str. 261 – 263.

Marin M., Koko V., Duletić-Laušević A., Marin P.D., Rančić D., Dajic-Stevanovic Z. (2006) Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany* **72**: 378 - 382.

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

Messaoud G. B., Sánchez-González L., Jacquot A., Probst L., Jeandel-Elmira C., Desobry S. (2016) Physico-chemical properties of alginate/shellac aqueous-core capsules: influence of membrane architecture on riboflavin release. *Carbohydrate Polymers* **144**: 428 - 437.

Miraldi E., Giachetti D., Mazzoni G., Biagi M. (2010) Quali-quantitative analysis of eight *Rosmarinus officinalis* essential oils of different origin. First report. *Journal of the Siena Academy of Sciences* **2**: 42 - 43.

Morales E., Rubilar M., Burgos-Díaz C., Acevedo F., Penning M., Shene C. (2017) Alginate/shellac beads developed by external gelation as a highly efficient model system for oil encapsulation with intestinal delivery. *Food Hydrocolloids* **70**: 321 - 328.

Moreno S., Scheyer T., Romano C. S., Vojnov A. A. (2005) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research* **40(2)**: 223 - 231.

Munin A., Edwards-Lévy F. (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a Review. *Pharmaceutics* **3**: 793 - 829.

Nazzaro F., Orlando P., Fratianni F., Coppola R. (2011) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 182 - 186.

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

Önal S., Timur S., Okutucu B., Zihnioglu F. (2005) Inhibition of α -glucosidase by aqueous extract of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **35**: 29 - 36.

Patel A. R., Velikov, K. P. (2011) Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *Lwt-Food Science and Technology* **44(9)**: 1958 - 1964.

Pawar S. N., Edgar K. J. (2012) Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* **33**: 3279 - 3305.

Popescu M. L., Mihaela D., Ursache D. D. (2010) Contributions to the pharmacognostical and phytobiological study on *Taraxacum officinale* (L.) Weber. *Farmacia* **58(5)**: 646 - 653.

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'INVEST* **26**: 1231-1237.

Ribeiro A., Caleja C., Barros L., Santos-Buelga C., Barreiro M. F., Ferreira I. C. F. R. (2016) Rosemary extracts in functional foods: extraction, chemical characterization and incorporation of free and microencapsulated forms in cottage cheese. *Food & Function* **7(5)**: 2185 - 2196.

Ribeiro Santos R., Carvalho Costa D., Cavaleiro C., Costa H. S, Gonçalves Albuquerque T., Conceição Castilho M., Ramos F., Melo N. R., Sanches-Silva A. (2016) A novel insight on an ancient aromatic plant: the rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology* **45(2)**: 355 - 368.

Roy A., Bajpai J., Bajpai A. K. (2009) Dynamics of controlled release of chlorpyrifos from swelling and eroding biopolymeric microspheres of calcium alginate and starch. *Carbohydrate Polymers* **76(2)**: 222 - 231.

- Sanna V., Roggio A. M., Siliani S., Piccinini M., Marceddu S., Mariani A., Sechi M. (2012) Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *International Journal of Nanomedicine* **7**: 5501 - 5516.
- Schütz K., Carle R., Schieber K. (2006) Taraxacum – a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 313 - 323.
- Singh B., Sharma D. K., Kumar R., Gupta A. (2009) Controlled release of the fungi-cide thiram from starch-alginate-clay based formulation. *Applied Clay Science* **45(1-2)**: 76 - 82.
- Singh M. N., Hemant K. S. Y., Ram M., Shivakumar H. G. (2010) Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences* **55**: 65 - 77.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 1179.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology* **299**: 152.
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *SCI DIR'INVEST* **16**: 144-158.
- Sohail M., Iqbal Z., Afzal M., Afzal A., Ur Rahman I., Shad S., Ahmed B., Anjum N., Qureshi K., Bibi A. 2014 In vitro antibacterial study of *Taraxacum officinale* leaves extracts against different bacterial pathogenic strains. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **3(2)**: 15 - 17.
- Sotelo-Félix J. I., Martínez-Fong D., Muriel P., Santillán R. L., Castillo D., Yahuaca P. (2002) Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus Officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* **81**: 145 - 154.

Škrovánková S., Mišurcová L., Machů L. (2012) Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Advances in Food and Nutrition Research* **67**: 75 - 139.

Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N. R., Nogueira J. M. F., Saraiva J. A., Nunes M. L. (2013) Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* **43(0)**: 587 - 595.

Toplak Galle K. (2005) Domaće Ljekovito Bilje, 1. izd., Mozaik knjiga. str. 240

Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231 - 1246.

Vallverdú-Queralt A., Regueiro J., Martínez-Huélamo M., Rinaldi Alvarenga J. F., Leal L. N., Lamuela-Raventos R. M. (2014) A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry* **154**: 299 - 307.

Vandamme T. F., Poncelet D., Subra-Paternault P. (2007) Microencapsulation: Des Sciences aux Technologies, 2. izd., Lavoisier Tec & Doc.

Vicente G., Molina S., González-Vallinas M., García-Risco M. R., Fornari T., Reglero G., de Molina A. R. (2013) Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *The Journal of Supercritical Fluids* **79**: 101 - 108.

Vilstrup P. (2001) Microencapsulation of Food Ingredients, 1. izd., Leatherhead Publishing. str. 151 - 184.

Wan L. Q., Jiang J., Arnold D. E., Guo X. E., Lu H. H, Mow V. C. (2008) Calcium concentration effects on the mechanical and biochemical properties of chondrocyte-alginate constructs. *Cellular and Molecular Bioengineering* **1(1)**: 93 - 102.

Wang J., Li H., Chen Z., Liu W., Chen H. (2016) Characterization and storage properties of a new microencapsulation of tea polyphenols. *Industrial Crops and Products* **89**: 152 - 156.

Willfort R. (2002) Ljekovito Bilje i Njegova Upotreba, 1. izd., Erudit. str. 371

Wojdyło A., Oszmianowski J., Czemerys R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* **105**: 940 - 949.

Zhao Q. S., Ji Q. X., Cheng X. J., Sun G. Z., Ran C., Zhao B., Chen X. G. (2010) Preparation of alginate coated chitosan hydrogel beads by thermosensitive internal gelation technique. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **54**: 232 - 237.

Yesil-Celiktas O., Girgin G., Orhan H., Wichers H. J., Bedir E., Vardar-Sukan F. (2007) Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *European Food Research and Technology* **224**: 443 - 451.

Yesil-Celiktas O., Sevimli C., Bedir E., Vardar-Sukan F. (2010) Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition* **65**: 158 - 163.