

# Utjecaj različitih sustava nosača na inkapsulacijsku učinkovitost polifenolnih spojeva lista maslačka (Taraxacum officinale L.)

---

Karača, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:736197>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Sara Karača

708/N



**UTJECAJ RAZLIČITIH SUSTAVA  
NOSAČA NA INKAPSULACIJSKU  
UČINKOVITOST POLIFENOLNIH  
SPOJEVA LISTA MASLAČKA  
(*Taraxacum officinale* L.)**



Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr.sc. Draženke Komes te uz pomoć asistentice Arijane Bušić, mag. ing.



Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes na iznimnoj susretljivosti, podršci i nesebičnoj pomoći pri izradi ovoga rada i na pruženoj mogućnosti za stjecanjem novih iskustava i vještina rada u laboratoriju koje sam stekla pri njegovoj izradi.

Najljepše se zahvaljujem asistentici Arijani Bušić, mag.ing., na pomoći, podršci, nesebičnom angažmanu i strpljenju pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se zahvaljujem članovima obitelji i prijateljima na podršci i pomoći tijekom studiranja i izvršavanja obaveza na fakultetu.





# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UTJECAJ RAZLIČITIH SUSTAVA NOSAČA NA INKAPSULACIJSKU UČINKOVITOST POLIFENOLNIH SPOJEVA LISTA MASLAČKA (*Taraxacum officinale* L.)

Sara Karača, 708/N

**Sažetak:** U svrhu povećanja bioraspoloživosti, učinkovitosti i stabilnosti polifenolnih spojeva, posljednjih je godina sve veći interes znanstvenih krugova, ali i industrije, usmjeren na mikroinkapsulaciju biljnih polifenola. Cilj ovog rada bio je inkapsulirati polifenolne spojeve lista maslačka primjenom postupka ionskog geliranja. Kao nosač za inkapsulaciju korišten je alginat (A) te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke (IPS) te kakaovim prahom (KP), rogačem i zelenom kavom, kao novim materijalima za imobilizaciju aktivnih spojeva. Također, ispitan je utjecaj koncentracije alginata (4% i 5%) na inkapsulacijsku učinkovitost polifenola maslačka. Osim toga, formuliranim česticama ispitane su fizikalno-kemijske i morfološke karakteristike, inkapsulacijska učinkovitost i kinetika otpuštanja polifenola u simuliranim gastrointestinalnim fluidima. Veća koncentracija alginata rezultirala je većim česticama i njihovim sferičnijim oblikom te tvrdom, ali elastičnijom teksturom. „Jačanje“ alginatnog gela izolatima proteina sirutke i kakaovim prahom pokazalo je velik potencijal primjene tih prirodnih sirovina u svrhu inkapsulacije polifenola, budući da je najveća inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina ostvarena upotrebom sustava A-IPS, dok je najbolju kinetiku otpuštanja istih pokazao sustav A-KP.

**Ključne riječi:** alginat, ionsko geliranje, izolati proteina sirutke, maslačak, polifenoli

**Rad sadrži:** 82 stranice, 20 slika, 10 tablica, 159 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Arijana Bušić, mag.ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Durgo
2. Prof.dr.sc. Draženka Komes
3. Doc.dr.sc. Ana Belščak-Cvitanović
4. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković (zamjena)

**Datum obrane:** 23. rujna 2016.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Food Engineering**

**Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **THE INFLUENCE OF DIFFERENT CARRIER SYSTEMS ON ENCAPSULATION EFFICIENCY OF DANDELION (*Taraxacum officinale* L.) LEAF POLYPHENOLS**

*Sara Karača, 708/N*

**Abstract:** In order to increase the bioavailability, efficiency and stability of polyphenols, the scientific community and the industry have shown a higher interest for microencapsulation of plant polyphenols in the recent years. The aim of this study was to encapsulate the polyphenolic compounds of dandelion leaves using the method of ionic gelation. Alginate (A) and its combinations with new materials for immobilization of active compounds, such as whey protein isolates (WPI), cocoa powder (CP), carob and green coffee were used as encapsulation carriers. The influence of alginate concentration (4% and 5%) on the encapsulation efficiency of dandelion polyphenols was also examined. Furthermore, obtained hydrogel particles' physicochemical and morphological characteristics were examined, along with the encapsulation efficiency and release kinetics of polyphenols in simulated gastrointestinal fluids. The higher alginate concentration resulted in larger particles that had a more spherical shape and a harder texture. Reinforcement of alginate gel with whey protein isolates and cocoa powder showed a great potential for using those natural materials to encapsulate the polyphenolic compounds, since the highest rate of encapsulation efficiency of total polyphenols and hydroxycinnamic acids was accomplished using the A-WPI delivery system and the best release profile of total polyphenols and hydroxycinnamic acids was accomplished using the A-CP delivery system for encapsulation.

**Keywords:** alginate, dandelion, ionic gelation, polyphenols, whey protein isolates

**Thesis contains:** 82 pages, 20 figures, 10 tables, 159 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Draženka Komes, Full professor

**Technical support and assistance:** Arijana Bušić, BSc

**Reviewers:**

1. PhD. Durgo, Associate professor
2. PhD. Draženka Komes Full professor
3. PhD. Ana Belščak Cvitanović, Assistant professor
4. PhD. Ksenija Marković, Associate professor

**Thesis defended:** September 23, 2016



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> L.) .....	3
2.1.1. Kemijski i bioaktivni sastav maslačka .....	3
2.1.2. Zdravstveni učinci bioaktivnih spojeva maslačka .....	4
2.2. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva .....	5
2.3. Inkapsulacija .....	7
2.3.1. Metode inkapsulacije aktivnih tvari .....	7
2.3.1.1. Ionsko geliranje .....	9
2.3.2. Čimbenici koji utječu na učinkovitost inkapsulacije mikročestica .....	10
2.3.3. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari .....	13
2.3.3.1. Prirodni biopolimeri za inkapsulaciju aktivnih tvari .....	14
2.3.3.2. Alginat .....	15
2.3.4. Morfologija i veličina čestica .....	17
2.3.5. Mehanizmi otpuštanja aktivnih tvari iz hidrogel čestica .....	17
2.3.6. Primjena metode inkapsulacije u proizvodnji funkcionalne hrane .....	18
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>20</b>
3.1. Materijal .....	20
3.1.1. Uzorci .....	20
3.1.2. Kemikalije .....	20
3.1.3. Aparatura i pribor .....	22
3.2. Metode rada .....	23
3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....	23
3.2.2. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina .....	24
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta .....	25
3.2.3.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	25
3.2.3.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	26
3.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....	27
3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka .....	29
3.2.6. Karakterizacija čestica .....	30
3.2.6.1. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika formuliranih čestica .....	30
3.2.6.2. Određivanje morfoloških karakteristika formuliranih čestica .....	33
3.2.6.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta .....	33
3.2.6.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz inkapsuliranih čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima .....	34
3.2.6.5. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom .....	34
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>35</b>
4.1. Određivanje bioaktivnog profila ekstrakta maslačka .....	36
4.2. Određivanje pojedinačnih polifenola ekstrakta maslačka primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti .....	36
4.3. Karakterizacija čestica .....	37
4.3.1. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika formuliranih čestica .....	37
4.3.1.1. Određivanje veličine formuliranih čestica .....	38



4.3.1.2. Određivanje teksture formuliranih čestica .....	39
4.3.1.3. Određivanje udjela vode u formuliranim česticama .....	42
4.3.1.4. Određivanje parametara boje formuliranih čestica .....	43
4.3.2. Određivanje morfoloških karakteristika formuliranih čestica .....	45
4.3.2.1. Određivanje oblika i strukture formuliranih čestica .....	45
4.3.2.2. Analiza mikrostrukture formuliranih čestica primjenom SEM mikroskopije .....	47
4.3.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta .....	50
4.3.3.1. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola .....	50
4.3.3.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina .....	51
4.3.3.3. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	53
4.3.3.4. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	54
4.3.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz inkapsuliranih čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima .....	56
4.3.4.1. Praćenje otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima .....	56
4.3.4.2. Praćenje otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima .....	58
4.3.4.3. Praćenje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima DPPH metodom .....	60
4.3.4.4. Praćenje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima ABTS metodom .....	62
4.3.5. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva razbijenih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka .....	63
4.3.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom .....	65
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>68</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>69</b>





# 1. UVOD

Uloga hrane u suvremenom načinu života nadilazi osnovnu svrhu osiguravanja potrebnih hranjivih tvari, jer se od hrane zahtijeva da predstavlja i bogat izvor biološki aktivnih sastojaka, čijom konzumacijom bi se ostvarili pozitivni učinci na zdravlje. Zahvaljujući povećanom interesu potrošača za hranom koja doprinosi poboljšanju zdravlja, odnosno nutraceuticima (Wildman, 2001), sektor proizvodnje funkcionalne hrane postao je jedan od najbrže rastućih sektora prehrambene industrije (Mollet i Lacroix, 2007). Veliki je broj funkcionalnih sastojaka hrane, poput vitamina, probiotika, bioaktivnih peptida, antioksidanasa i sl., a broj znanstvenih dokaza o utjecaju hrane na pozitivne zdravstvene učinke svakim danom je sve veći (Wildman, 2001). Osim pozitivnih zdravstvenih učinaka, potrošači od funkcionalne hrane očekuju i poželjna senzorska svojstva (zadovoljavajući okus, aromu i izgled) te kvalitetu blisku onoj tradicionalnih proizvoda koji se nalaze na tržištu (Augustin, 2001; Kwak i Jukes, 2001; Klahorst, 2006). Funkcionalni proizvodi nove generacije obogaćuju se ponajviše antioksidansima i biljnim ekstraktima, ali i  $\omega$ -3 masnim kiselinama, vitaminima, mineralnim tvarima, prebioticima, probioticima i prehranbenim vlaknima. No, učinkovitost nutraceutičkih komponenata hrane u sprječavanju razvoja bolesti uvelike ovisi o njihovoj biorasploživosti u ljudskom organizmu (Langer i Peppas, 2003). Osim toga, mnoge od navedenih aktivnih tvari sklone su degradaciji uslijed skladištenja ili procesiranja tijekom određenog vremenskog razdoblja i/ili su sklone stupati u interakcije s drugim komponentama hrane, što uzrokuje smanjenje kvalitete funkcionalnih prehranbenih proizvoda. U svrhu sprječavanja takvih promjena, u posljednjih nekoliko godina sve se više koristi tehnika inkapsulacije bioaktivnih tvari, s ciljem zaštite tih osjetljivih komponenata od uvjeta sredine u kojoj se nalaze. Među velikim brojem metoda inkapsulacije, u proizvodnji funkcionalne hrane ponajviše se koriste metode ionskog geliranja i koacervacije (Smith i Charter, 2010). Također, materijali koji se koriste za inkapsulaciju moraju biti „*food-grade*“, no, važno je i da su biorazgradivi te sposobni izgraditi barijeru između jezgre materijala (aktivne tvari, punjenja) i njezine okoline. Dakle, osim što moraju biti prirodni, materijali za inkapsulaciju aktivnoj tvari moraju pružiti visoki stupanj zaštite od okolišnih uvjeta (vlage, temperature, pH), zadržavati je unutar strukture mikroapsule tijekom procesiranja i/ili skladištenja u različitim uvjetima, ne smiju stupati u interakcije s inkapsuliranom aktivnom tvari, moraju posjedovati dobra reološka svojstva u visokim koncentracijama te omogućavati lako rukovanje prilikom inkapsulacije. U tu svrhu ponajviše se koriste nosači sastavljeni od različitih polimernih materijala (Peppas i sur., 2000). Najčešće korišteni prirodni polimer za inkapsulaciju je alginat, ponajviše zbog jednostavne primjene, biokompatibilnosti i niske cijene (Goh i sur., 2012). No, nedostatak njegovoj primjeni predstavlja poroznost alginatnog gela, zbog čega je otežano zadržavanje

polifenolnih spojeva unutar takvog nosača, stoga se alginat često kombinira s drugim prirodnim materijalima poput proteina (Augustin, 2003), koji, primjerice, mogu kemijski vezati polifenolne spojeve i na taj način povećavati inkapsulacijsku učinkovitost istih (Yong-Lee i Hong-Yuk, 2007).

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.), jestiva i ljekovita te vrlo lako dostupna biljka, odlikuje se visokim udjelom različitih polifenolnih spojeva, među kojima prevladavaju hidroksicimetne kiseline. No, unatoč velikom potencijalu primjene u prevenciji i liječenju različitih bolesti, njegov bioaktivni sastav ipak još uvijek nije dovoljno istražen. Podaci o inkapsulaciji polifenola ove biljke su ograničeni te je, prema dostupnoj literaturi, do sada inkapsuliran jedino ekstrakt cvijeta maslačka ionskim geliranjem alginata i pektina u emulzijama (Belščak-Cvitanović i sur., 2016).

Upravo iz tog razloga, cilj ovog rada je inkapsulacija polifenolnih spojeva ekstrakta lista maslačka (*Taraxacum officinale* L.), primjenom postupka ionskog geliranja i korištenjem različitih sustava nosača. Kao osnovni nosač za inkapsulaciju polifenola maslačka koristit će se alginat, a u svrhu smanjenja poroznosti alginatnog hidrogela, isti će se kombinirati s izolatima proteina sirutke, kakaovim prahom, rogačem i zelenom kavom. Dodatkom kakaovog praha, rogača i zelene kave u matriks alginatnog gela ispitat će se potencijal ovih novih, neistraženih materijala za inkapsulaciju polifenola, ali i utjecaj koncentracije alginata na ispitivane parametre. Ekstraktu maslačka prvotno će se odrediti polifenolni profil, a zatim će se provesti karakterizacija formuliranih alginatnih čestica. Hidrogel česticama s inkapsuliranim polifenolima lista maslačka odredit će se fizikalno-kemijski parametri (veličina, tvrdoća, elastičnost, boja, udjel vode) te morfološke karakteristike (izgled čestica). Ispitat će se učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta unutar formuliranih sustava, kao i profil otpuštanja ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MASLAČAK (*Taraxacum officinale* L.)

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je trajna zeljasta višegodišnja livadna biljka iz obitelji *Asteraceae* koja raste i cvate od ranog proljeća do kasne jeseni. Cijela biljka je jestiva i ljekovita te bogata vitaminom C i mineralnim tvarima; kalijem, željezom, natrijem i fosforom, kao i eteričnim uljima i masnim kiselinama pa se zbog toga često skuplja s prirodnih staništa. Mladi listovi maslačka beru se prije nego biljka počne cvjetati, a najčešće se koriste za pripremu salata. Cvjetovi se koriste za pripremu meda, dok se korijenje vadi u jesen. Zbog visokog udjela inulina, korijen maslačka koristi se kao zamjena za kavu te dobro djeluje i na peristaltiku crijeva. Nutritivna vrijednost maslačka uvelike ovisi o agroklimatskim uvjetima u kojima raste, ali i o udjelu hranjivih tvari u tlu (Erhatic i sur., 2014).

#### 2.1.1. Kemijski i bioaktivni sastav maslačka

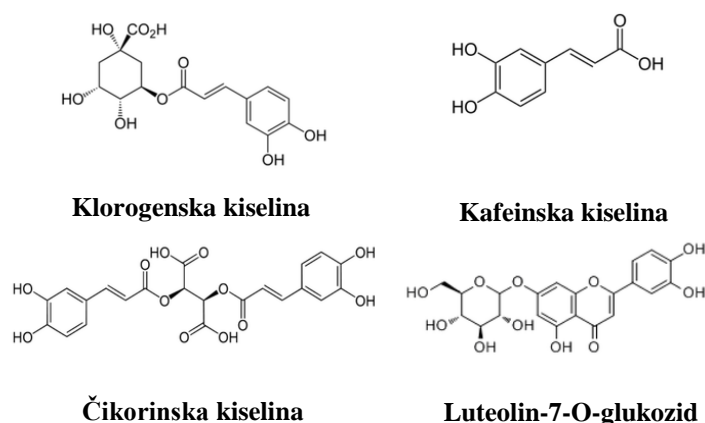
Što se tiče kemijskog profila maslačka, čitava biljka sadrži kolin (gorku tvar), škrob (koji se kod dužeg čuvanja pretvara u voćni šećer), saponine, masti, tragove eteričnog ulja, vosak, sluz, šećere, proteine, levulin i taraksin. Korijen maslačka sadrži i visok udjel kalija, kalcija, mangana, natrija, kremičnu kiselinu, sumpor i vitamin C (Willfort, 2002). Osim toga, listovi maslačka predstavljaju bogati izvor vitamina A, kojega sadrže u većem udjelu u odnosu na korijen mrkve, ali i kalija, koji je prisutan u udjelu od oko 297 mg na 100 grama listova (Barnes i sur., 1996; Williams i sur., 1996). Udjel pojedinih tvari u biljnim dijelovima mijenja se ovisno o godišnjem dobu. Primjerice, svježi korijen, iskopan u proljeće (od sredine ožujka do sredine travnja), sadrži većim dijelom gorku tvar kolin, prema sredini kolovoza se umjesto mliječnog soka stvara inulin, dok je u listopadu u korijenu maslačka prisutno najviše taraksina i levulina. Visok udjel vitamina C zabilježen je u mladim listovima u proljeće (Willfort, 2002).

Listovi, cvjetovi i korijen maslačka predstavljaju bogat izvor polifenolnih spojeva. No, udjel polifenola veći je u cvjetovima i listovima, odnosno vanjskim dijelovima biljke ( $9,9 \pm 0,28$  g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka), nego u korijenu ( $0,086 \pm 0,003$  g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka) (González-Castejón i sur., 2012).

Najvažniji bioaktivni spojevi lista biljke maslačka su flavonoidi luteolin i luteolin 7-diglukozidi (Williams i sur, 1995), luteolin-7-glukozid (Slika 1), kvercetin, kvercetin-7-glukozid i luteolin-7-rutinozid (Wolbis i Krolikowska, 1985; Wolbis i sur., 1993). Isti polifenolni spojevi prisutni su također i u cvijetu maslačka, kao i apigenin-7-glukozid (Hörhammer i Wagner, 1962) te skopoletin i eskuletin, prisutni i u korijenu biljke (Komissarenko i Derkach, 1981).

Od hidroksicimetnih kiselina, u cvijetu, korijenu i listovima biljke prisutne su kafeinska, klorogenska i čikorinska kiselina (Slika 1), od kojih je čikorinska kiselina zastupljena u najvećem udjelu (González-Castejón i sur., 2012). Cvijet maslačka sadrži i određeni udjel  $\beta$ -karotena (Belščak-Cvitanović i sur., 2016) te flavona krisoeriola (Williams i sur., 1995).

Korijen biljke maslačka obiluje hidroksibenzojevim kiselinama, ferulinskom i vanilinskom kiselinom te kumarinima umbeliferonom, čikorinom i eskulinom (Schütz i sur., 2006; Williams i sur., 1995). U listovima i korijenu maslačka detektirana je i prisutnost p-hidroksifeniloctene kiseline (Williams i sur., 1996).



**Slika 1.** Kemijske strukture najznačajnijih polifenola maslačka (Chen i sur., 2012)

### 2.1.2. Zdravstveni učinci bioaktivnih spojeva maslačka

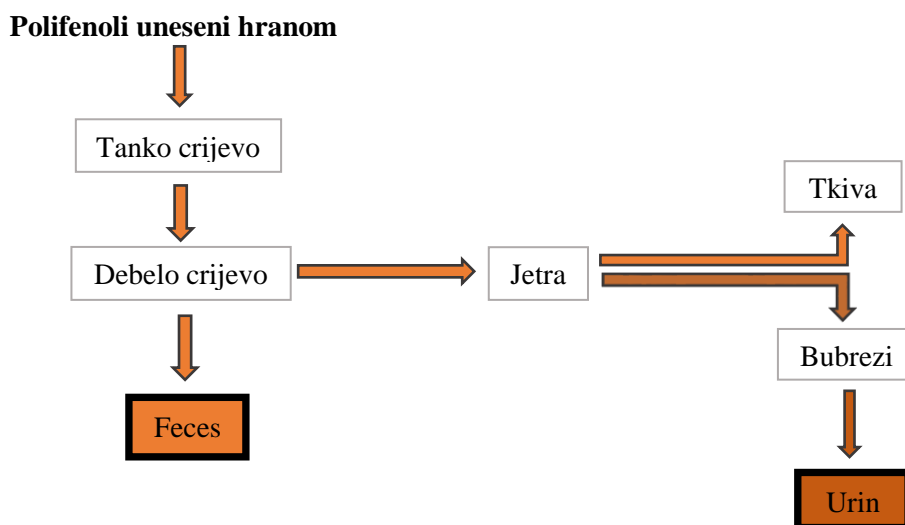
List maslačka koristi se u narodnoj medicini kao dobar diuretik te je učinkovit u snižavanju visokog krvnog tlaka (Grlić, 1990). Osim toga, rezultati nekoliko istraživanja dokazali su da tretman maslačkom može poboljšati opće zdravlje, smanjujući mogućnost razvoja upalnih procesa i tumora (Kim i sur., 2007; Sigstedt i sur., 2008). Budući da svi dijelovi biljke sadrže visoki udjel polifenolnih spojeva, maslačak ima i antioksidacijsko djelovanje (González-Castejón i sur., 2012). Iako postoji iznenađujuće malo podataka o ulozi maslačka u sprječavanju razvoja pretilosti, nedavna studija Davaatserena i suradnika (2013) pokazala je da ekstrakt lista ove biljke (u udjelu od 2 i 5 g/kg tjelesne mase), kod laboratorijskih miševa hranjenih hranom s visokim udjelom masti, smanjuje tjelesnu masu u odnosu na kontrolnu skupinu te smanjuje inzulinsku rezistenciju za 49%. Najvjerojatniji mehanizam ovakvog učinka *T. officinale* je *in vitro* i *in vivo* inhibicija pankreasne lipaze (Zhang i sur., 2008). Nadalje, Choi i suradnici (2010) dokazali su hipolipidemički učinak lista maslačka kod zečeva hranjenih hranom visokog udjela masti. Rezultati navedenog istraživanja (kod tretiranih laboratorijskih zečeva, u odnosu na kontrolnu skupinu) dokazali su učinkovitost lista maslačka u poboljšanju lipidnog profila (ukupni udjel triglicerida smanjen je za 36%, LDL kolesterola za 11%,

a ukupna koncentracija HDL kolesterola povećana je za 29%). Osim toga, zabilježeno je i smanjenje debljine aorte za 58% u odnosu na kontrolnu skupinu. Mehanizmima smanjenja povišene tjelesne mase i poboljšanja lipidnog profila inhibicijom sinteze adipocita i redukcijom akumulacije masti u diferenciranim zrelim adipocitima (Garcaí-Carrasco i sur., 2015), maslačak utječe i na smanjenje rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Choi i sur., 2010; Zhang i sur., 2008).

## **2.2. BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLNIH SPOJEVA**

Iako se polifenoli koriste u brojnim sektorima prehrambene industrije kao prirodni aditivi, najvažnije područje primjene polifenolnih spojeva je svakako ono usmjereno na poboljšanje ljudskoga zdravlja. Mnogi biljni ekstrakti bogati polifenolima koriste se kao dodaci prehrani ili se mogu implementirati u različite kozmetičke ili farmaceutske proizvode (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Učinkovitost polifenolnih spojeva u poboljšanju zdravlja uvelike ovisi o njihovoj bioraspoloživosti. Bioraspoloživost predstavlja udjel hranjive tvari koji je probavljen, apsorbiran i metaboliziran uobičajenim putem. Bioraspoloživost svakog pojedinog polifenolnog spoja se razlikuje, a udjel polifenola koji se unese hranom često ne odgovara njihovoj bioraspoloživosti u ljudskom organizmu (Pandey i Rizvi, 2009). Zbog nedovoljnog vremena zadržavanja u želucu te niske permeabilnosti i/ili topljivosti, mali dio oralno unesenih molekula je apsorbiran u gastrointestinalnom traktu. Njihova nestabilnost tijekom procesiranja hrane, distribucije i skladištenja, ali i smanjena stabilnost u probavnom sustavu (zbog niske pH vrijednosti želuca, prisutnosti enzima i drugih nutrijenata), utječe na ograničenu aktivnost i ispoljavanje potencijalno povoljnih učinaka polifenola na zdravlje. Neizravan parametar koji ukazuje na dobru apsorpciju polifenola kroz gastrointestinalni trakt je povećanje antioksidacijskog kapaciteta plazme nakon konzumacije hrane bogate polifenolima. Ovakva zapažanja rezultat su istraživanja na hrani i piću koji sadrže visok udjel polifenolnih spojeva u svojem sastavu, poput čaja (Serafini i sur., 1996; van het Hof i sur., 1997), crnog vina (Duthie i sur., 1998; Fuhrman i sur., 1995; Maxwell i sur. 1994; Serafini i sur., 1998; Whitehead i sur., 1995) ili soka od crnog ribiza i jabuke (Young i sur., 1999). Neposredniji pokazatelj bioraspoloživosti nekolicine polifenolnih spojeva je njihova koncentracija u plazmi i urinu nakon unosa bilo čistih polifenolnih spojeva ili hrane s poznatim udjelom ispitivanog spoja. Istraživanja koja se temelje na ovakvim mjerenjima dokazala su da veoma veliki udjel polifenola (75-99%) nije prisutan u urinu nakon njegove ingestije, što ukazuje ili na izostanak njihove apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, apsorpcije i izlučivanja u žuči ili provedbe metaboličkih procesa od strane crijevne mikroflore vlastitog organizma (Scalbert i Williamson, 2000). Slika 2

prikazuje moguće puteve prolaska oralno unesenih polifenola kroz gastrointestinalni (GI) i urinarni trakt čovjeka.



**Slika 2.** Mogući putevi prolaska oralno unesenih polifenola kroz GI i urinarni trakt (Scalbert i Williamson, 2000)

Mnoštvo kemijskih i biokemijskih čimbenika utječe na bioraspoloživost polifenola. Polifenolni spojevi se u hrani i pićima nalaze u različitim kemijskim oblicima koji uvjetuju njihovu apsorciju u GI traktu, a sama kemijska struktura polifenola utječe na odvijanje reakcija njihove biotransformacije, odnosno konjugacije s metilnim, sulfatnim ili glukuronidnim skupinama te prirodu i količinu metabolita formiranih od strane crijevne mikroflore (Scalbert i Williamson, 2000).

Nažalost, polifenolni spojevi oksidiraju veoma brzo, što dovodi do razvoja smeđe boje i/ili nepoželjnih mirisa i značajnog gubitka aktivnosti u prehrambenim, ali i drugim proizvodima u kojima se upotrebljavaju. Veliki broj polifenolnih spojeva iz prirodnih izvora zanimljiv je različitim industrijama, međutim, većina njih u svojoj slobodnoj formi pokazuje slabu sposobnost topljivosti u vodi. Osim toga, mnogi polifenoli imaju neugodan okus, koji je potrebno maskirati prije inkorporiranja u prehrambene proizvode ili lijekove. Zbog toga je važno da završni proizvod koji sadrži polifenolne spojeve ima sposobnost zadržati strukturni integritet polifenola do trenutka konzumacije ili primjene, maskirati njihov okus, povećati njihovu topljivost u vodi i bioraspoloživost te usmjeriti njihovo djelovanje u točno određenom (fiziološkom) smjeru. Među postojećim stabilizacijskim metodama, jedna od najkorištenijih je tehnika inkapsulacije, koja predstavlja učinkovitu zaštitu polifenola, ali i drugih aktivnih spojeva, njihovom ugradnjom u zaštitne nosače.

## **2.3. INKAPSULACIJA**

U posljednjih nekoliko godina u području prehrambene tehnologije ubrzano je porasla potreba za dodatkom funkcionalnih spojeva i nutraceutika u prehrambene proizvode. Te komponente obično su iznimno osjetljive na okolišne uvjete, uvjete procesiranja hrane i/ili uvjete u gastrointestinalnom sustavu čovjeka (McClements i Lesmes, 2009). Iz tih je razloga razvijena tehnika inkapsulacije, koja predstavlja proces „pakiranja“ bioaktivnih agenasa, odnosno spojeva, unutar određenih materijala, tzv. nosača - polupropusnih matriksa (Gasperini i sur., 2014). Inkapsulacija se može definirati i kao tehnika „pakiranja“ čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala u male kapsule (promjera 1-1000  $\mu\text{m}$ ) koje otpuštaju inkapsulirani sadržaj kontroliranom brzinom i isključivo u određenim uvjetima (Desai i Park, 2005). Tvar koja je inkapsulirana naziva se još i jezgra materijala, aktivna tvar, punjenje i unutarnja faza, a tvar koja čini ovojnica premaz, membrana, ljuska, stijenka materijala ili vanjska faza (Wandrey i sur., 2009; Fang i Bhandari, 2010). Inkapsulacija predstavlja tehniku korisnu za imobilizaciju bioaktivnih molekula i živih stanica u prehrambene proizvode (Nedović i sur., 2011). Njegov glavni cilj je očuvati stabilnost bioaktivnih komponenata hrane tijekom procesiranja i skladištenja i spriječiti nepoželjne interakcije između sastojaka, npr. bioaktivnih spojeva i matrica hrane u koje se mikroinkapsulirani sastojci implementiraju. Budući da mnoge bioaktivne spojeve karakterizira brza inaktivacija u gastrointestinalnom traktu, ova tehnika je od iznimne koristi jer usporava proces njihove degradacije (npr. reakcijama oksidacije ili hidrolize) ili je potpuno sprječava do trenutka kada bioaktivni spoj dospije na željeno mjesto u probavnom sustavu (McClements i Lesmes, 2009). Dakle, inkapsulacija pomaže da bioaktivni sastojci hrane ostanu potpuno funkcionalni. Osim u tu svrhu, ova se tehnika može koristiti i za modificiranje fizikalnih svojstava izvornog materijala u svrhu lakšeg rukovanja ili razdvajanja komponenata smjese koji bi inače mogli stupati u interakcije jedni s drugima te za osiguravanje željene koncentracije i jednolike disperzije bioaktivnih sastojaka, a nerijetko se koristi i za „maskiranje“ nepoželjnih mirisa i okusa pojedinih sastojaka hrane (Desai i Park, 2005). Mikroinkapsulirani proizvodi učestalo se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, ali i u mnogim drugim područjima i proizvodima, poput proizvoda za osobnu njegu, veterinarskim lijekovima, industrijskim kemikalijama, poljoprivrednoj i biomedicinskoj industriji (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

### **2.3.1. Metode inkapsulacije aktivnih tvari**

Metode inkapsulacije stanica i aktivnih tvari se, prema izvedbi, mogu podijeliti u četiri skupine:



- Fizikalne metode → sušenje raspršivanjem, inkapsulacija korištenjem superkritičnih fluida
- Fizikalno – kemijske metode → inkapsulacija hlađenjem emulzija, emulzifikacija i uklanjanje otapala, metode temeljene na hidrofobnim interakcijama, metode temeljene na ionskim interakcijama
- Kemijske metode → *in situ* polimerizacija, granična polikondenzacija i granično unakrsno povezivanje (eng. "cross-linking")
- Ostale metode inkapsulacije → inkapsulacija u stanicama kvasaca, ko-kristalizacija, molekularna inkluzija (Munin i Edwards-Lévy, 2011)

U Tablici 1 nalazi se pregled najčešće inkapsuliranih aktivnih tvari primjenom različitih tehnika inkapsulacije.

**Tablica 1.** Pregled najčešće inkapsuliranih aktivnih tvari i korištenih tehnika inkapsulacije te odgovarajućih nosača za inkapsulaciju

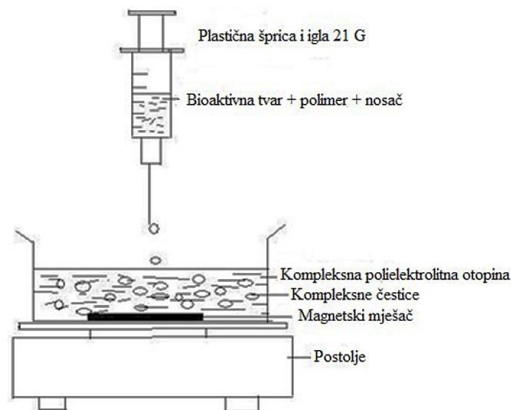
Aktivna tvar		Metoda inkapsulacije	Nosač	Referenca
<b>Vitamini i minerali</b>	Vitamin B12	Emulzifikacija	Kazeinat/dekstran	Fechner i sur., 2007
	Vitamin D2	Mikroinkapsulacija micelama	Kazein	Semo i sur., 2007
	Željezo	Molekularna inkluzija	Ciklodekstrini	Leite i sur., 2003
	Kalcij	Ionsko geliranje	Alginat	Koushki i sur., 2015. Olivas i sur., 2008
<b>Esencijalne masne kiseline</b>	EPA, DHA, $\alpha$ -linolenska i konjugirana linolna kiselina	Koacervacija	Hidroksipropil metilceluloza	Wu i sur., 2005
		Kompleksacija ciklodekstrinom i mikroinkapsulacija liposomima	Ciklodekstrini, lipidi	Tanouchi i sur., 2007
		Ionsko geliranje	Kitozan	Srinivasa i sur., 2007

**Tablica 1.** Pregled najčešće inkapsuliranih aktivnih tvari i korištenih tehnika inkapsulacije te odgovarajućih nosača za inkapsulaciju - nastavak

Aktivna tvar	Metoda inkapsulacije	Nosač	Referenca	
<b>Probiotici</b>	Ionsko geliranje	Alginat/kitozan	Urbanska i sur., 2007	
	Fluid-bed metoda	Lipidi	Lee i Richardson, 2004	
	Sušenje raspršivanjem	Protein/ugljikohidrat sustav	Crittenden i sur., 2006	
<b>Fitokemikalije</b>	Resveratrol	Mikroinkapsulacija u stanicama kvasca	<i>S. cerevisiae</i>	Shi i sur., 2008
		Ionsko geliranje	Kitozan/alginat	Deladino i sur., 2008
	Kurkumin	Mikrofluidizacija	Lecitin	Takahashi i sur., 2007
		Molekularna inkluzija	Ciklodeskrini	Szente i sur., 1998
	β-karoten	Ionsko geliranje	Alginat, pektin	Belščak-Cvitanović i sur., 2016
	Polifenoli maslačka	Ionsko geliranje	Alginat, pektin	Belščak-Cvitanović i sur., 2016
	Polifenoli lista kupine, gloga, stolisnika, bršljana, koprive i masline	Ionsko geliranje	Alginat/kitozan sustav	Belščak-Cvitanović i sur., 2011
	Polifenoli lista ružmarina	Ionsko geliranje	Kitozan	Xiao i sur., 2010
	Katehin i epigalokatehin	Ionsko geliranje	Kitozan/tripolifosfat (TPP)	Dube i sur., 2010
Polifenoli čaja	Ionsko geliranje	Kitozan	Liang i sur., 2011	
<b>Vlakna</b>	Kitoooligosaharid	Ionsko geliranje	Poliglicerol monostearat	Choi i sur., 2006

### 2.3.1.1. Ionsko geliranje

Jedna od najkorištenijih tehnika inkapsulacije je ionsko geliranje, koje uključuje ekstruziju (istiskivanje) otopine polimera kroz iglu za ubrizgavanje, u kojoj je aktivni spoj otopljen ili dispergirani. Kapljice se prenose do sredstva za raspršivanje faza (gelirajućeg medija) te nakon reakcije prelaze u sferične čestice gela (Vandamme i sur., 2007) (Slika 3), kao npr. u slučaju natrijevog alginata korištenog s kalcijevim kloridom kao gelirajućim medijem.



**Slika 3.** Formiranje hidrogela tehnikom ionskog geliranja (Patil i sur., 2012)

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

Tehnika ionskog geliranja je jednostavna i blaga, a čimbenici o kojima ovisi njezina učinkovitost te oblik i veličina nastalih čestica su: koncentracija polimera i kationa za geliranje, temperatura, pH otopine za geliranje i koncentracija bioaktivnog sastojka (Racovića i sur., 2009).

### 2.3.2. Čimbenici koji utječu na učinkovitost inkapsulacije mikročestica

Na inkapsulacijsku učinkovitost bioaktivnih spojeva unutar formuliranih mikročestica utječu različiti parametri, poput:

#### 1. Topljivosti polimera u organskom otapalu

Mehta i suradnici (1996) proučavali su topljivost različitih PLGA (eng. „*polylactic-co-glycolic acid*“) polimera u metilen kloridu te su zaključili da su polimeri niže molekulske mase bolje topljivi u navedenom organskom otapalu od polimera više molekulske mase. Osim toga, hidrofobniji polimeri također su bili bolje topljivi u metilen kloridu. Difuzija bioaktivnih tvari u kontinuiranu fazu odvijala se većinom tijekom prvih deset minuta emulzifikacije, dakle, što je bio duži vremenski period zadržavanja polimera u tekućem ili polučvrstom stanju, to je inkapsulacijska učinkovitost bila manja. Polimerima slabije topljivosti u metilen kloridu bilo je potrebno duže vrijeme za očvršćivanje, što je rezultiralo nižom inkapsulacijskom učinkovitošću i obrnuto. Veličina i gustoća mikročestica se

također razlikovala ovisno o polimeru. Budući da su se polimeri bolje topljivosti u metilen kloridu dulje zadržavali u polučvrstom stanju, disperzna faza je postajala sve koncentriranijom prije nego što je potpuno očvrstnula, uzrokujući tako nastanak mikročestica veće gustoće.

## *2. Topljivosti organskog otapala u vodi*

Bodmeier i McGinity (1988) su svojim istraživanjem otkrili da metilen klorid povećava inkapsulacijsku učinkovitost u usporedbi s kloroformom ili benzenom, iako je metilen klorid, u usporedbi s druga dva navedena otapala, bolje otapalo za PLGA. Razlog tome je bolja topljivost metilen klorida u vodi, koja omogućava relativno brzi prijenos mase između disperzne i kontinuirane faze i dovodi do brze precipitacije polimera. Dakle, dok topljivost polimera u organskom otapalu uvjetuje količinu tvari koja nije otapalo za precipitaciju polimera, topljivost organskog otapala u tvari koja je otapalo (vodi) ograničava difuziju te tvari u polimernu fazu (Jyothi i sur., 2010).

## *3. Koncentracije polimera*

Inkapsulacijska učinkovitost raste povišenjem koncentracije polimera (Mehta i sur., 1996; Rafati i sur., 1997; Li i sur., 1999). Na primjer, u istraživanju Mehtae i suradnika (1996), povišenjem koncentracije polimera s 20,0% na 32,5%, inkapsulacijska učinkovitost porasla je s 53,1% na 70,9%. Utjecaj visoke koncentracije polimera na povećanje inkapsulacijske učinkovitosti može se objasniti na dva načina. Prvo objašnjenje je brza precipitacija polimera u visokoj koncentraciji na površini disperzne faze, što sprječava difuziju bioaktivne tvari preko granica faze (Rafati i sur., 1997). Drugo objašnjenje je da visoka koncentracija polimera povećava viskoznost otopine i odgađa difuziju bioaktivne tvari unutar kapljice polimera (Bodmeier i McGinity, 1988).

## *4. Omjera disperzne i kontinuirane faze (DF/KF)*

Inkapsulacijska učinkovitost i veličina mikročestica rastu s povećanjem volumena kontinuirane faze (Mehta i sur., 1996; Li i sur., 1999). Na primjer, u istraživanju Mehtae i suradnika (1996), inkapsulacijska učinkovitost je porasla za više od dva puta smanjenjem omjera disperzne i kontinuirane faze (DF/KF) s 1:50 na 1:300. Moguće objašnjenje takvog utjecaja na inkapsulacijsku učinkovitost je da veliki volumen kontinuirane faze uzrokuje visoki koncentracijski gradijent organskog otapala na granici faza, razrjeđujući otapalo i dovodeći do brzog očvršćivanja mikročestica. Osim toga, niski omjer DF/KF uzrokuje i nastanak mikročestica niže gustoće (Sah, 1997) te smanjuje poroznost mikročestica (Jyothi i sur., 2010).

## 5. Brzine uklanjanja otapala

Način i brzina uklanjanja otapala utječu na brzinu očvršćivanja disperzne faze te morfologiju nastalih mikročestica (Mehta i sur., 1994). Prilikom provođenja metode evaporacije/ekstrakcije u sustavu emulzija-otapalo, samo otapalo može se ukloniti evaporacijom, pri čemu dolazi do isparavanja otapala pri dostizanju točke vrelišta, ili ekstrakcijom u kontinuiranu fazu. Na brzinu uklanjanja otapala pri evaporaciji može se utjecati promjenama temperature, dok je brzinu uklanjanja otapala pri ekstrakciji moguće kontrolirati promjenama volumena za razrjeđivanje. U istraživanjima Mehtae i suradnika (1994) te Jeyanthija i suradnika (1996), PLGA mikročestice formulirane su emulzifikacijom, nakon čega su uslijedili različiti procesi uklanjanja otapala. Prilikom procesa uklanjanja otapala ovisnog o temperaturi, otapalo (metilen klorid) je uklonjeno povišenjem temperature s 15 °C na 40 °C različitim brzinama. Mikročestice nastale navedenim procesom sadržavale su šuplju srž i poroznu stijenku, dok su veličina čestica i debljina stijenke ovisili o brzini promjene temperature. Brzo povišenje temperature rezultiralo je česticama tanke stijenke i velike, šuplje srži, dok je lagano, postepeno povišenje temperature utjecalo na formiranje čestica manjih veličina. Prilikom kontrolirane ekstrakcije, otapalo je uklanjano postepeno i polako, razrjeđivanjem kontinuirane faze, čime su dobivene visokoporozne čestice strukture nalik na pčelinje saće, uz izostanak pojave šuplje srži.

## 6. Interakcije između bioaktivne tvari i polimera

Interakcije između proteina i polimera doprinose povećanju inkapsulacijske učinkovitosti (Boury i sur., 1997). Općenito, proteini su sposobni stupati u ionske interakcije i učinkovitije se inkapsuliraju primjenom polimera koji sadrže slobodne karboksilne skupine na krajevima, od onih koji ih ne sadrže. S druge strane, ukoliko je hidrofobna interakcija dominantna sila između proteina i polimera, relativno hidrofobni polimeri zatvoreni na krajevima (eng. „*end-capped*“; ne sadrže slobodne karboksilne skupine) imat će veću sposobnost povećavanja inkapsulacijske učinkovitosti (Mehta i sur., 1996).

## 7. Topljivosti bioaktivne tvari u kontinuiranoj fazi

Do gubitka bioaktivne tvari u kontinuiranoj fazi dolazi kada disperzna faza duže vrijeme ostaje u prijelaznom, polučvrstom stanju. Ukoliko je topljivost bioaktivne tvari u kontinuiranoj fazi veća nego u disperznoj fazi, bioaktivna tvar će lakše difundirati u kontinuiranu fazu prilikom navedenog stadija (Jyothi i sur., 2010). Na primjer, inkapsulacijska učinkovitost kvindin sulfata je u istraživanju Bodmeiera i McGinityja (1988) bila 40 puta veća u lužnatoj kontinuiranoj fazi (pH 12, pri kojem je

kvinidin sulfat netopljiv) od inkapsulacijske učinkovitosti u neutralnoj kontinuiranoj fazi (pH 7, pri kojem je kvinidin sulfat veoma dobro topljiv).

Na Slici 4 nalazi se shematski prikaz mehanizma djelovanja navedenih čimbenika na inkapsulacijsku učinkovitost aktivne tvari unutar mikročestica (Jyothi i sur., 2010).



**Slika 4.** Mehanizam djelovanja različitih čimbenika na inkapsulacijsku učinkovitost aktivne tvari unutar mikročestica (Yeo i Park, 2004)

### 2.3.3. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari

Za inkapsulaciju čvrstih, tekućih ili plinovitih aktivnih tvari različitih vrsta i karakteristika mogu se koristiti različiti materijali. No, prilikom odabira materijala za inkapsulaciju valja uzeti u obzir činjenicu da je zakonska regulativa vezana uz prehrambene aditive i nutraceutike mnogo stroža, nego za farmaceutike. Različiti kemijski spojevi odobreni za inkapsulaciju lijekova i njihovih komponenata nisu odobreni i za upotrebu u prehrambenoj industriji, budući da mnogi od njih nisu uvršteni na GRAS (eng. „*Generally recognized as safe*“) listu, odnosno nisu prepoznati kao sastojci sigurni za korištenje u proizvodnji hrane. Općenito, cijeli proces proizvodnje hrane mora biti osmišljen i izveden na način da odgovara sigurnosnim zahtjevima i propisima nadležnih agencija, kao što su EFSA (Europska agencija za sigurnost hrane; eng. „*European Food Safety Agency*“) u EU ili FDA (Američka agencija za hranu i lijekove; eng. „*Food and Drug Administration*“) u SAD-u. Osim toga, materijali koji se koriste za inkapsulaciju moraju biti „*food-grade*“ (odnosno, ne smiju kontaminirati hranu bilo kakvim svojim sastojcima i komponentama koje s njom dolaze u izravni kontakt), biorazgradivi te sposobni izgraditi barijeru između jezgre materijala (aktivne tvari,

punjenja) i njezine okoline. Dakle, osim što moraju biti prirodni, materijali za inkapsulaciju aktivnoj tvari moraju pružati najveći mogući stupanj zaštite od okolišnih uvjeta (vlage, temperature, pH), zadržavati je unutar strukture mikrokapsule tijekom procesiranja i/ili skladištenja u različitim uvjetima, ne smiju stupati u interakcije s inkapsuliranom aktivnom tvari, moraju posjedovati dobra reološka svojstva u visokim koncentracijama te se njima mora moći lako rukovati prilikom inkapsulacije (Wandrey i sur., 2010). Mnogi od materijala koji udovoljavaju navedenim uvjetima su prirodno proizvedeni polimeri koji stvaraju hidrogelove – visokohidratizirane strukture sastavljene od unakrsno povezanih (eng. „*cross-linked*“) hidrofilnih polimera koji formiraju trodimenzionalne mreže (Uludag i sur., 2000).

#### *2.3.3.1. Prirodni biopolimeri za inkapsulaciju aktivnih tvari*

Hidrogelovi se definiraju kao mreže polimera koje imaju sposobnost vezati velike količine vode, ostajući pritom netopljivi u vodenim otopinama, zahvaljujući kemijskom ili fizikalnom unakrsnom povezivanju pojedinačnih polimernih lanaca (Peppas i sur., 2000). Hidrogelovi proizvedeni od prirodnih materijala imaju strukturu sličnu strukturi izvanstaničnog matriksa mnogih ljudskih tkiva. Sastavljeni su od polimera koji nalikuju biološkim makromolekulama (Malafaya i sur., 2007), a u cilju inkapsulacije bioaktivnih tvari najčešće se koriste proteini i polisaharidi.

##### *1. Proteini*

U svrhu formiranja nosača za inkapsulaciju bioaktivnih tvari, u posljednje vrijeme se koristi veliki broj različitih „*food-grade*“ proteina, poput kazeina i proteina sirutke iz mlijeka, ali i želatine, miozina iz ribe ili mesa te zeina iz kukuruza, glutena iz pšenice, proteina soje, proteina kikirikija ili proteina sjemenki pamuka. Pri temperaturi od 70 °C oni se denaturiraju i postaju netopljivi, što im omogućava stvaranje ireverzibilnih gelova različite kvalitete. Skupljanje i geliranje proteina pogoduje stvaranju veza s inkapsuliranim sastojkom, a sama učinkovitost procesa geliranja može se pospješiti dodatkom iona u pregrijanu otopinu, u prvome redu iona kalcija (Wandrey i sur., 2010). Općenito, proteini olakšavaju transport bioaktivnih komponenata zbog svojstva vezanja liganada (Augustin i Hemar, 2008).

##### *2. Polisaharidi*

Osim proteina, u svrhu formiranja nosača za inkapsulaciju svoju primjenu nalazi i veliki broj polisaharida, poput škroba i njegovih derivata, derivata celuloze, kitozana, alginata, karagenana, pektina, ksantan gume, guar gume, gume sjemenki rogača – karuba gume, itd. (Cui, 2005). Na

molekularnoj razini, ovi polisaharidi razlikuju se prema molekularnoj masi, stupnju razgranatosti, konformaciji, električnom naboju i hidrofobnosti. Općenito, razlike u molekularnim karakteristikama biopolimera uvjetovat će razlike u njihovoj sposobnosti da stvaraju strukturirane nosače za inkapsulaciju bioaktivnih tvari, ali i razlike u fizikalno-kemijskim karakteristikama i funkcionalnosti formiranih nosača (Benichou i sur., 2002; Norton i Frith, 2001; Schmitt i sur., 1998).

### 3. Lipidi

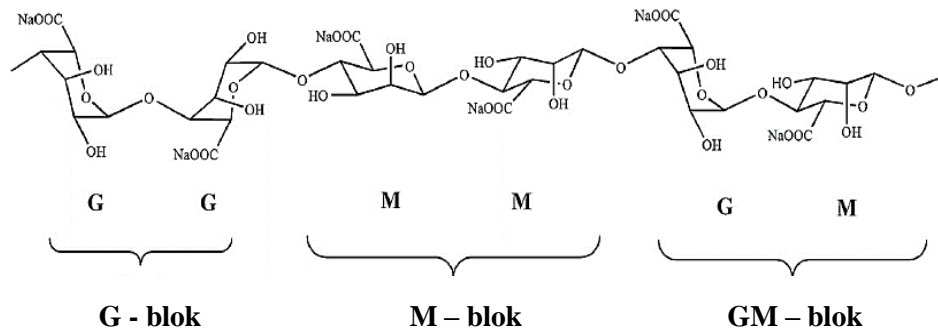
Iako nešto rjeđe, i lipidi nalaze svoju primjenu u inkapsulaciji stanica, gdje služe kao strukturni nosači. U tu svrhu najčešće se koriste masne kiseline i alkoholi, voskovi (pčelinji vosak, karnauba vosak, kandelila vosak), gliceridi te fosfolipidi (Gasperini i sur., 2014).

Valja naglasiti da se i biopolimeri mogu klasificirati u skupine na temelju stupnja razgranatosti lanaca. Većina proteina posjeduje ravne lance, dok polisaharidi mogu sadržavati ravne ili razgranate lance. U otopinama, biopolimeri općenito mogu biti prisutni u obliku pojedinačnih molekula ili se mogu nalaziti u obliku supramolekularnih struktura, kod kojih su molekule biopolimera povezane s jednom ili više molekula iste vrste. Osim toga, u uvjetima promijenjenog okoliša (promjena pH, ionske jakosti, sastava otapala, temperature), biopolimeri mogu prelaziti iz jedne konformacije u drugu, ali i iz jednog agregatnog stanja u drugo. Dakle, konformacija i interakcije između biopolimera igraju važnu ulogu u određivanju njihove sposobnosti da stvaraju strukturirane inkapsulacijske nosače (Cui, 2005).

#### 2.3.3.2. Alginat

Alginat, jedan od najčešće korištenih biopolimera za inkapsulaciju stanica, je polisaharid, odnosno polianionski linearni kopolimer koji se sastoji od blokova  $\beta$ -D-manuronske (M - blok) i  $\alpha$ -L-guluronske (G - blok) kiseline povezane  $\alpha$ -1,4 glikozidnom vezom (Rowley i sur., 1999). Dobiva se ekstrakcijom iz mnogih vrsta smeđih morskih algi, a proizvode ga i dvije vrste bakterija, one iz rodova *Pseudomonas* i *Azotobacter* (Remminghorst i Rehm, 2006). Pri ekstrakciji iz morskih algi, alge se ubiru i čiste te se alginat ekstrahira pomoću otopine natrijeve soli, nakon čega slijedi precipitacija (Calumpong i sur., 1999). Kemijska struktura natrijevog alginata prikazana je na Slici 5.





**Slika 5.** Kemijska struktura natrijevog alginata (Daemi i Barikani, 2012)

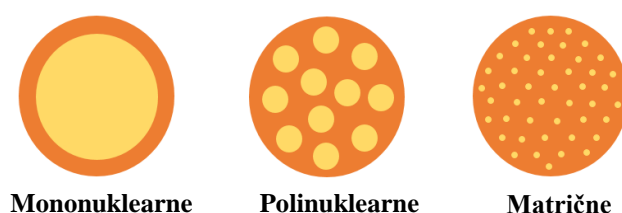
Ovaj se polimer učestalo koristi za inkapsulaciju terapijskih agenasa (Goh i sur., 2012), a otkako su Lim i Sun (1980) pomoću njega prvi put uspješno proveli mikroinkapsulaciju Langerhaansovih otočića (dijelovi gušterače, sadrže endokrine stanice koje proizvode hormone i izlučuju ih u krv), postao je najistraživanijim materijalom za inkapsulaciju živih stanica (de Vos i sur., 2006; Murua i sur., 2008). Kada se viševalentni kationi (npr.  $\text{Ca}^{2+}$ ) dodaju vodenoj otopini alginata, oni vežu susjedne alginatne lance, formirajući pritom ionske mostove između lanaca, što uzrokuje stvaranje gelova. Općenito se pretpostavlja da se kationi vežu ponajprije na G – blokove lanaca, ali novija istraživanja ukazuju i na mogućnost da M – blokovi (odnosno, izmjenjujući GM – blokovi) imaju važnu ulogu u unakrsnom povezivanju polimernih lanaca (Donati i sur., 2005). Alginate, kao materijale za inkapsulaciju, karakterizira veoma širok raspon veličina pora (5-200 nm), pri čemu gornji dio raspona čine alginati s visokim udjelom G – blokova u strukturi (Smidsrod i sur., 1990; Martinsen i sur., 1989). Propusnost alginata je uvelike uvjetovana koncentracijom i prirodom iona koji utječu na učvršćivanje; veće koncentracije iona stvaraju čvršće strukture (posebice u vanjskom dijelu gela) (Aslani i Kennedy, 2006). Korištenjem soli koje su slabo topljive u vodi (npr.  $\text{CaCO}_3$ ), formirana struktura bit će uniformnija i stvoreni hidrogelovi imat će veću mehaničku stabilnost (Kuo i Ma, 2001). Kinetika topljivosti alginatnih gelova *in vivo* ovisi prvenstveno o omjeru G/M – blokova i potaknuta je izmjenom unakrsno vezanih iona s monovalentnim kationima okolnih tekućina, a razgraditi ih mogu alginaze, enzimi odsutni u organizmu sisavaca. No, njihova razgradnja u sisavaca može se potaknuti kemijskom modifikacijom lanca. Kratkotrajna oksidacija alginata korištenjem natrijevog peroksida dovodi do stvaranja polimera koji se razgrađuje u vodenom mediju, bez većeg utjecaja na njegovu sposobnost da stvara gelove (Gomez i sur., 2007; Bouhadir i sur., 2001; Boonthekul i sur., 2005). Topljivost alginatnih gelova *in vitro* može se postići i zamjenom iona puferom ili korištenjem agenasa poput EDTA ili natrijevog citrata (Gillette i sur., 2010). Alginat je svakako najproučavaniji materijal za inkapsulaciju (Murua i sur., 2008) i postao je uobičajeno korišten u mnoge biomedicinske svrhe. Dugo se vremena koristi kao zaštitna barijera za poboljšanje staničnih terapija, imunosnu zaštitu Langerhaansovih otočića gušterače (de Vos i sur., 2006; Lim i

Sun, 1980), liječenje tumora na mozgu (Kuo i Ma, 2001), anemije (Murua i sur., 2009) i krioprezervaciju (očuvanje stanica zamrzavanjem) (Gryshkov i sur., 2013).

### 2.3.4. Morfologija i veličina čestica

Morfologija čestica dobivenih inkapsulacijom uglavnom ovisi o materijalu jezgre i omotača (Slika 6) te se, s obzirom na morfološka svojstva, čestice dijele na:

- 1) mononuklearne čestice (sadrže omotač oko jezgre)
- 2) polinuklearne čestice (imaju mnogo jezgri koje se nalaze unutar omotača)
- 3) matrične čestice (tvar jezgre je homogeno raspoređena u materijalu omotača) (Jyothi i sur., 2012)



**Slika 6.** Podjela mikročestica s obzirom na morfološka svojstva (Prilagođeno iz Jyothi i sur., 2010)

S obzirom na veličinu, čestice dobivene inkapsulacijom dijele se na:

- 1) nanočestice, nanokapsule ili nanosfere (10 - 1000 nm)
- 2) mikročestice, mikrokapsule ili mikrosfere veličine od 2 do 2000  $\mu\text{m}$
- 3) makročestice ( $\geq 2000 \mu\text{m}$ ) (Singh i sur., 2010; Mohanraj i Chen, 2006)

### 2.3.5. Mehanizmi otpuštanja aktivnih tvari iz hidrogel čestica

Hidrogelovi posjeduju mnogo karakteristika koje ih čine podobnima za očuvanje i zaštitu bioaktivnih tvari od uvjeta okoliša. Zbog svoje hidrofilnosti, hidrogelovi unutar svog sastava mogu sadržavati velike količine vode (oko 90%). Dakle, mehanizmi otpuštanja bioaktivnih tvari iz hidrogelova uvelike se razlikuju od mehanizama otpuštanja iz hidrofobnih polimera (Lin i Metters, 2006). Svi mehanizmi temelje se na čimbenicima koji ograničavaju kontrolirano otpuštanje bioaktivne komponente iz hidrogela te se dijele u tri skupine:

#### 1. Mehanizmi kontrolirani difuzijom

Ovi mehanizmi su najprimjenjiviji i najkorišteniji pri opisivanju otpuštanja bioaktivnih tvari iz hidrogelova. Temelje se na Fickovom zakonu difuzije, a sposobnost difuzije samih bioaktivnih tvari obično se određuje empirijski ili se procjenjuje na temelju slobodnog volumena, hidrodinamike ili

teorija temeljenih na opstrukciji (Amsden, 1998). Kod poroznih hidrogelova, u slučaju kada je veličina pora mnogo veća od molekularnih dimenzija same bioaktivne tvari, koeficijent difuzije je u bliskoj vezi s poroznošću hidrogela (Peppas, 1986). No, kod neporoznih hidrogelova i gelova čija je veličina pora slična molekularnim dimenzijama bioaktivne tvari, koeficijent difuzije je smanjen zbog sterične (prostorne) prepreke koju postavljaju polimerni lanci unutar unakrsno povezanih umreženih struktura (Amsden, 1998; Peppas, 1986; Masaro i Zhu, 1999).

## *2. Mehanizmi kontrolirani bubrenjem*

Otpuštanje kontrolirano bubrenjem javlja se u trenutku kada je brzina difuzije bioaktivne tvari veća od brzine bubrenja hidrogela. Modelno prikazivanje ovog mehanizma obično uključuje promjenu, odnosno pomicanje graničnih uvjeta reakcije te dolazi do otpuštanja molekula na granici između tzv. „gumene“ faze, u kojoj molekule ubrzano difundiraju, i „staklene“ faze nabubrenih hidrogelova, u kojoj molekule bioaktivne tvari ostaju imobilizirane unutar matriksa hidrogela. U takvim sustavima, brzina otpuštanja molekula bioaktivne tvari ovisi o brzini bubrenja hidrogela. Ovim mehanizmom obično se otpuštaju male molekule iz hidrogelova koji sadrže hidroksipropil metilcelulozu (HPMC) (Siepmann i Peppas, 2001).

## *3. Kemijski kontrolirani mehanizmi*

Kemijski kontrolirani mehanizmi otpuštanja najčešće se javljaju uslijed reakcija unutar samog matriksa hidrogela. Najčešće takve reakcije su cijepanje polimernih lanaca hidrolitičkom ili enzimatskom razgradnjom ili reverzibilnim ili ireverzibilnim interakcijama između polimerne mreže i bioaktivne tvari koja se otpušta. Pod određenim uvjetima, erozija površine ili unutrašnjosti hidrogela utjecat će na brzinu otpuštanja bioaktivne tvari (Peppas i sur., 2000; Amsden, 1998; Kanjickal i Lopina, 2004).

### **2.3.6. Primjena metode inkapsulacije u proizvodnji funkcionalne hrane**

Većina novih funkcionalnih proizvoda na tržištu obogaćena je poželjnim nutrijentima i aktivnim tvarima, uključujući vitamine, minerale, antioksidanse,  $\omega$ -3 masne kiseline, biljne ekstrakte, prebiotike i probiotike te prehrambena vlakna. Mnogi od tih spojeva skloni su degradaciji tijekom određenog vremenskog razdoblja i/ili su skloni stupati u interakcije s drugim komponentama hrane, što uzrokuje smanjenje kvalitete funkcionalnih prehrambenih proizvoda. U svrhu sprječavanja takvih promjena, u posljednjih nekoliko godina sve se više koristi tehnika inkapsulacije bioaktivnih tvari u svrhu izoliranja tih osjetljivih komponenata od uvjeta okoliša u kojemu se nalaze. Prema pretraženoj literaturi, u Tablici 2 nalazi se pregled dosad inkapsuliranih aktivnih tvari i sastojaka te hrane u koju

su te tvari ili sastojci implementirani, s korištenim metodama inkapsulacije za proizvodnju funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

**Tablica 2.** Pregled dosad inkapsuliranih aktivnih tvari i sastojaka te hrane u koju su te tvari ili sastojci implementirani

Aktivna tvar/sastojak	Metoda inkapsulacije	Hrana u koju je implementirana bioaktivna tvar/sastojak	Referenca
Polifenoli iz sjemenki nara (punikalagini)	Sušenje raspršivanjem	Sladoled	Çam i sur., 2014
Ekstrakt sjemenki grejpfruta	Sušenje raspršivanjem	Keksi	Davidov-Pardo i sur., 2015
Likopen	Sušenje raspršivanjem	Kolač/biskvit	Rocha i sur., 2012
Konjugirana linolna kiselina – CLA	Sušenje raspršivanjem	Mliječni proizvodi	Jimenez i sur., 2008
Probiotička kultura <i>L. Casei</i>	Sušenje raspršivanjem	Sok od mrkve	Petreska-Ivanovska i sur., 2014
Probiotička kultura <i>L. Reuteri</i>	Sušenje raspršivanjem	Čokoladni soufflé	Malmo i sur., 2013
Bakterije mliječne kiseline	Sušenje raspršivanjem	Kuhano mesno tijesto	Pérez-Chabela i sur., 2013
Ekstrakt lista djeteline	Sušenje raspršivanjem	Sojino ulje	Chatterjee i Bhattacharjee, 2013
Probiotici	Ionsko geliranje	Mliječni proizvodi	Kailasapthy i sur., 2008
			Ortakci i Sert, 2012
			Sandoval-Castilla i sur., 2010
			Urbanska i sur., 2007
			Amine i sur., 2014
			Sohail i sur., 2012
			Özer i sur., 2008
		Homayouni i sur., 2008	
		Mesni proizvodi (fermentirane kobasice)	Muthukumarasamy i Holley, 2007
			Muthukumarasamy i Holley, 2006
		Voćni sokovi	Ding i Shah, 2008
Krasaekoopt i Watcharapoka, 2014			
Drugi proizvodi od voća	Sohail i sur., 2012		
	Sohail i sur., 2012		
Limonen	Inkapsulacija u kvascima	Instant tjestenina i rezanci	Dardelle i sur., 2007
Intracelularni enzimi bakterije mliječne kiseline	Inkapsulacija u kvascima	Sir Cheddar	Yarlagadda i sur., 2014
Polifenoli biljke stolisnika ( <i>Achillea millefolium</i> L.)	Elektrostatska ekstruzija, sušenje smrzanjem	Čokolada	Belščak-Cvitanović i sur., 2012

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Uzorci

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

Ekstrakt maslačka pripremljen je prelijevanjem 30 g suhog i usitnjenog uzorka maslačka s 300 mL destilirane vode, temperature 80 °C. Ekstrakcija je provedena zagrijavanjem pri konstantnoj temperaturi od 80 °C uz neprestano miješanje staklenim štapićem tijekom 30 minuta. Nakon ekstrakcije, uzorak je procijeđen kroz metalno cjedilo s dva sloja pamučne gaze, nadopunjen do poznatog volumena (300 mL) te ohlađen na sobnu temperaturu. Dobivenom ekstraktu primjenom spektrofotometrijskih metoda određen je udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet, dok je udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva određen primjenom HPLC metode.

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

#### 3.1.2. Kemikalije

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

##### Određivanje udjela ukupnih polifenola:

- Folin-Ciocalteu reagens Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

##### Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

- Klorovodična kiselina (HCl), Kemika (Hrvatska)
- Arnov reagens – smjesa natrijevog nitrita (Gram-mol d.o.o.; Zagreb, Hrvatska) i natrijevog molibdata (Sigma-Aldrich; Steinham, Njemačka)

- Natrijev hidroksid (NaOH), Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska)

#### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)

#### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- Etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

#### Kemikalije korištene pri HPLC analizi:

- Redestilirana voda, AQUA pro injectione (Zagreb, Hrvatska)
- o-fosforna kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Nizozemska)

#### Polimerni nosači za mikroinkapsulaciju:

- Natrijev alginat, Sigma-Aldrich Company Ltd. (Dorset, Velika Britanija)
- Izolati proteina sirutke, Davisco Foods International (La Suer, MN, SAD)
- Kakaov prah, Zvečevo d.d. (Požega, Hrvatska)
- Rogač, Šafram d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Zelena kava (Etiopija)

#### Određivanje udjela suhe tvari:

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

#### Kemikalije korištene pri pripremi simulirane gastične tekućine (SGF):

- Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)

#### Kemikalije korištene pri pripremi simulirane intestinalne tekućine (SIF):

- Kalijev dihidrogen-fosfat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Spektrofotometrijske analize:

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

#### HPLC analize:

- Celulozno-acetatni mikrofilteri veličine pora 0,45  $\mu$ m (CA-45/25), Machery-Nagel (Düren, Njemačka)
- HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC-PDA sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC kolona Zorbax Extended C-18 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)

#### Određivanje udjela suhe tvari:

- Aluminijske posudice s poklopcima, termometar, eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik, Tehtnica (Železniki, Slovenija)

#### Ostali korišteni instrumenti i pribor:

- Magnetne mješalice, 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 (Velika Britanija)
- Cilindrična čelična sonda P/2, Stable Micro Systems (Velika Britanija)

- Kolorimetar, CM – 700d, CM – A177, Konica Minolta (Tokio, Japan)
- Mikroskop Leica DM1000 LED (Cambridge, Velika Britanija)
- Elektronički mikroskop, TESCAN Mira3 microscope (Ceske Budojevice, Češka)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

#### *Princip metode:*

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

#### *Postupak rada:*

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100  $\mu$ L uzorka, 500  $\mu$ L Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 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 pripremljena je na isti način kao i uzorci koji se ispituju, osim što reakcijska smjesa umjesto 100  $\mu$ L uzoraka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzoraka 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 paralelne probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g čestica.

### 3.2.2. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

*Princip metode:*

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina temelji se na reakciji kiselinske hidrolize popraćene razvojem ružičasto-crvenkastog obojenja čiji se intenzitet određuje mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel hidroksicimetnih kiselina izravno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

*Postupak rada:*

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

Udjel hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

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

Gdje su:

x – udjel kafeinske kiseline (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm

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

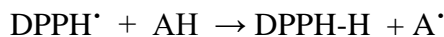
### 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva maslačka (*T. officinale* L.) provedeno je korištenjem DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) i ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) metoda.

#### 3.2.3.1. 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, a praćena je 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 apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



##### *Postupak rada:*

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

Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$ , koja se, prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a). Jednadžba baždarne krivulje glasi:

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

Gdje su:

x - koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L)

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

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

### 3.2.3.2. *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 kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

#### *Postupak rada:*

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka ABTS metodom, pripremi se otopina ABTS<sup>+</sup> 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 pomiješa se 88 µL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuni s otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, ne dolazi do potpune oksidacije, stoga je pripremljenu otopinu potrebno 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<sup>+</sup> radikala od 1%, tako da apsorbancija te otopine iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Volumen od 40 µL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzoraka, potrebno je izmjeriti asporbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 µL vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe, dobivena je vrijednost  $\Delta A$ , koja je korištena za izračunavanje konačnog rezultata. Jednadžba baždarne krivulje glasi:

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

Gdje su:

x - koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L)

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

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

### **3.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)**

Pojedinačni polifenolni spojevi određeni su primjenom HPLC metode u samom ekstraktu lista maslačka, kao i u otopini citrata razbijenih čestica, formuliranih s različitim sustavima nosača na bazi alginata.

*Priprema uzoraka:*

Ekstrakt lista maslačka prije injektiranja u kromatografski sustav razrijeđen je u omjeru 1:10 te profiltriran kroz celulozno-acetatne mikrofiltere veličine pora 0,45 µm.

Otopine razbijenih čestica, u svrhu uklanjanja polisaharida, razrijeđene su s metanolom u omjeru 1:1, kako bi se postigla precipitacija, nakon čega su centrifugirane, a supernatant profiltriran kroz odgovarajuće mikrofiltere prije injektiranja. U kromatografski sustav injektirano je 10 µL profiltriranog uzorka te je provedena analiza prema dolje navedenim uvjetima.

*Postupak rada:*

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je kromatografijom obrnutih faza na ACE Excel SuperC18 (250 x 4,6 mm, 5µm) koloni (nepolarna stacionarna faza) na temelju različitosti u polarnosti pojedinih komponenata eluacijom polarnim otapalima (Belščak-Cvitanović i sur., 2012).

Mobilna faza: A – 0,1% o-fosforna kiselina u vodi

B – 0,1% o-fosforna kiselina u metanolu

Protok: 1 mL/min

Eluiranje: gradijentno

Detekcija: UV/VIS Photo Diode Array ( $\lambda=278$  nm)

Temperatura kolone: sobna

Vrijeme trajanja analize: 30 min (+ 5 min Post Time)

**Tablica 3.** Gradijent otapala za HPLC analizu polifenolnih spojeva

t [min]	Otapalo A [%]	Otapalo B [%]	Protok [mL/min]
0	10	90	1,0
30	100	0	1,0

*Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva:*

Detekcija bioaktivnih spojeva provedena je snimanjem eluata na valnoj duljini 278 nm (UV područje) pomoću Photo Diode Array (PDA) detektora, pri čemu su dobiveni karakteristični kromatogrami uzoraka. Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću PDA detektora pri valnim duljinama od 200 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Identifikacija spojeva dobivenih kromatogramima provedena je usporedbom vremena zadržavanja ( $R_t$ ) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda te usporedbom s UV-spektrima standarda (oblik spektra i apsorpcijski maksimumi). Kvantitativno određivanje spojeva u uzorcima omogućeno je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca pojedinih standarda (Tablica 4).

**Tablica 4.** Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u ispitivanim uzorcima

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca
Klorogenska kiselina	$y = 13,597x - 5,332$
Kafeinska kiselina	$y = 54,365x + 26,068$
Čikorinska kiselina	$y = 15,025x - 4,3467$
Kaftarinska kiselina	$y = 11,209x - 2,0702$
Kafein	$y = 26,197x - 8,6714$
Teobromin	$y = 31,064 + 7,9437$

HPLC analize provedene su u dvije paralelne probe, a rezultati su izraženi kao mg/g uzorka te su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Za prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom korištena je aplikacija Star Chromatography Workstation Version 5, dok je obrada rezultata napravljena pomoću programa Microsoft Office Excel.

### 3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka

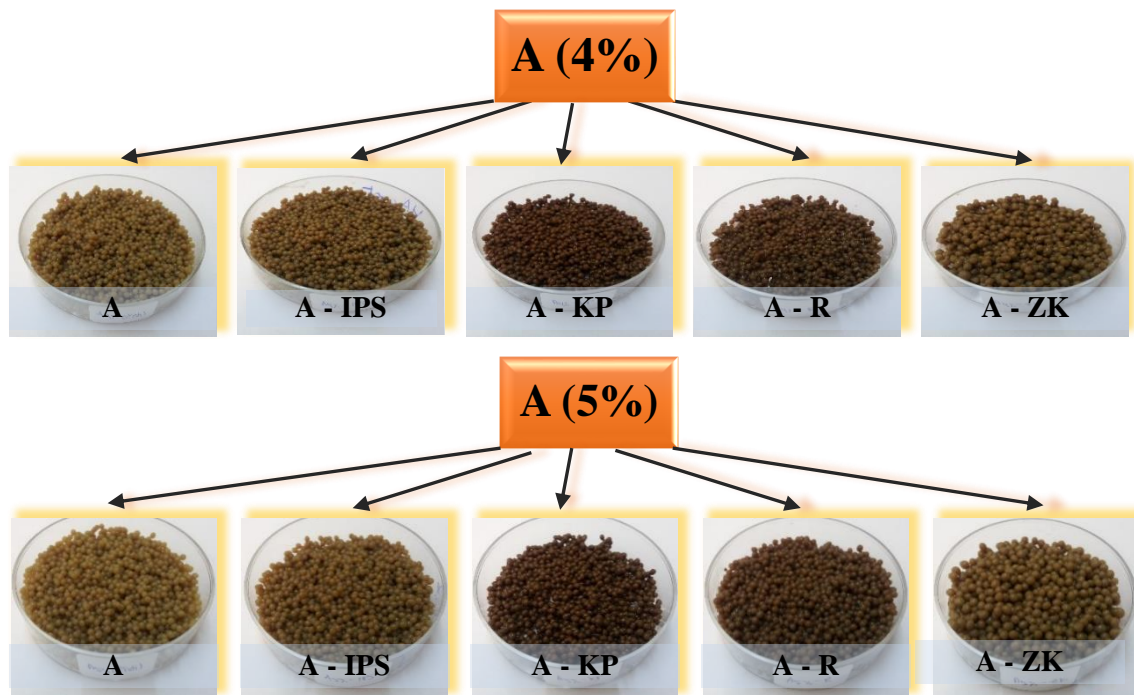
Kao materijali za formuliranje različitih sustava nosača korišteni su prirodni biopolimeri: alginat niske viskoznosti (A), izolati proteina sirutke (IPS) te kakaov prah (KP), rogač (R) i zelena kava (ZK). Otopina alginata pripravljena je u koncentracijama od 4 i 5% (w/v), dok je koncentracija ostalih materijala dodanih u alginatni sustav iznosila 20% (w/v).

Otopine svih nosača pripravljene su otapanjem navedenih materijala u prethodno pripremljenom ekstraktu maslačka (w/v), u odgovarajućem masenom odnosu. Otopine sustava nosača su zatim homogenizirane na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi tijekom 24 h te pomiješane u odgovarajućem omjeru. Pri tome su formulirani sljedeći sustavi, koji su zatim korišteni u daljnjim eksperimentima:

- Čisti alginat: A (4% i 5%)
- Alginat + izolati proteina sirutke: A– IPS (80:20, w/v)
- Alginat + kakaov prah: A– KP (80:20, w/v)
- Alginat + rogač: A– R (80:20; w/v)
- Alginat + zelena kava: A– ZK (80:20; w/v)

Prilikom inkapsulacije ionskim geliranjem, otopine za geliranje pripravljene su otapanjem 3%-tnog kalcijevog klorida u ekstraktu maslačka (w/v). Formiranje čestica provedeno je ukapavanjem sustava nosača pomoću plastične šprice i igle od 27 G (0,4x13 mm) i 18 G (18x40 mm) (u slučaju zelene kave) u prethodno pripravljene otopine za geliranje. Otopine za geliranje su tijekom postupka inkapsulacije miješane na magnetskoj mješalici, pri čemu je dolazilo do očvršćivanja kapi i formiranja u čestice sferičnog oblika. Nakon formiranja svih čestica, čestice su miješane u gelirajućem mediju dodatnih 30 min, nakon čega su izdvojene iz otopine kalcijevog klorida filtriranjem, isprane u ekstraktu te spremljene u ekstrakt na +4 °C do analiza.

Kombinacijom svih navedenih sustava nosača, formulirani su sljedeći sustavi, prikazani na Slici 7.



**Slika 7.** Shematski prikaz formuliranih sustava nosača za inkapsulaciju polifenola maslačka

Osim toga, kao kontrolne čestice formulirani su prethodno opisani sustavi nosača na bazi alginata, koji su umjesto polifenolnog ekstrakta maslačka sadržavali vodu.

### 3.2.6. Karakterizacija čestica

#### 3.2.6.1. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika formuliranih čestica

##### Određivanje veličine formuliranih čestica

Veličina alginatnih čestica određena je snimanjem čestica ( $n=10$ ) digitalnim fotoaparatom na Dino-Lite kalibracijskoj pločici (minimalni razmak=0,2 mm), iz čega je očitana veličina čestica. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost deset uzastopnih mjerenja.

##### Određivanje parametara teksture formuliranih čestica

Analiza teksture provedena je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), opremljenom s utegom od 5 kg. Analize su provedene na sobnoj temperaturi na tri različite čestice 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. Analiza teksture svakog uzorka provedena je 3 puta (na 3 različite čestice svakog sustava).

Dobiveni dijagrami obrađeni su u Texture Exponent programu (Stable Micro Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za ispitivane parametre teksture (tvrdoća i elastičnost). Tvrdoća uzorka izražena je kroz maksimalnu silu (N) potrebnu za kompresiju uzorka, 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.

#### Određivanje udjela vode u formuliranim česticama

##### *Princip metode:*

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

##### *Postupak rada:*

U prethodno osušene (do konstantne mase, pri 105 °C), ohlađene i izvagane aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom i poklopcem, odvagano je 1 g ( $\pm 0,0001$ ) formiranih čestica. Posudica s uzorkom i poklopac suše se oko 3 sata u sušioniku pri 105 °C. Nakon isteka vremena sušenja, aluminijska posudica s uzorkom pokrije se poklopcem dok je još u sušioniku, prebaci u eksikator, gdje se hladi na sobnoj temperaturi te ohlađena važe na analitičkoj vagi. Postupak se ponavlja sve dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici (s točnošću  $\pm 0,0003$  g).

##### *Izračun rezultata:*

Udjel vode izračuna se prema formuli (1), dok se udjel suhe tvari računa kao razlika udjela vode od 100% (2).

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (1)$$

Gdje su:

$m_1$  – masa prazne aluminijske posudice (g)

$m_2$  – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

$m_3$  – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

$$\text{Udjel suhe tvari (\%)} = 100\% - \text{Udjel vode (\%)} \quad (2)$$



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

### Određivanje boje formuliranih čestica

Određivanje boje uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan), pri čemu je dobivena reflektancija uzoraka u čitavom području vidljivog spektra te  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Nelinearni odnosi za  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti imaju zadatak imitirati logaritamski odgovor ljudskog oka. Ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koji su poznati kao plavi, zeleni i crveni receptori. Sukladno tome,  $L^*$  vrijednost je osvjetljenje ili svjetlosna komponenta, koja ima vrijednosti u rasponu 1-100, dok su  $a^*$  (od zelene do crvene) i  $b^*$  (od plave do žute) dvije kromatske vrijednosti u rasponu od -120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007). Za potrebe analize, uzorci inkapsuliranih čestica dobivenih ionskim geliranjem preneseni su u Petrijeve zdjelice promjera 50 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 ( $\Delta E^*$ ) izračunata je prema formuli:

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

Gdje je:  $\Delta E^*$  - 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 – čisti alginatni sustav

$a_{ref}^*$  - parametar boje referentnog uzorka – ekstrakt maslačka (crveno)

$b_{ref}^*$  - parametar boje referentnog uzorka – ekstrakt maslačka (žuto)

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

### *3.2.6.2. Određivanje morfoloških karakteristika formuliranih čestica*

#### *Određivanje oblika i strukture formuliranih čestica*

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

#### *Analiza mikrostrukture formuliranih čestica primjenom SEM mikroskopije*

Mikrostruktura inkapsuliranih čestica polifenolnog ekstrakta maslačka analizirana je primjenom SEM (eng. „*Scanning Electron Microscopy*“) mikroskopije, korištenjem TESCAN Mira3 mikroskopa (Češka). Princip rada mikroskopa zasniva se na skeniranju površine uzorka koristeći zrake elektrona, pri čemu se oblikuje slika. Za provođenje analize, uzorci su pozicionirani na poseban nosač i obloženi slojem zlata (50 nm), kako bi mogli odbijati elektrone te su analizirani koristeći napon zrake elektrona od 4-5 kV.

### *3.2.6.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta*

Udjel ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina imobiliziranih u alginatnim česticama, kao i antioksidacijski kapacitet, određen je otapanjem poznate količine profiltriranih čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), uz snažno miješanje na Vortex mikseru. Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteu reagensa (opisano u poglavlju 3.2.1.), udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u reakciji s Arnou-im reagensom (opisano u poglavlju 3.2.2.), dok je određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH i ABTS metode opisano u poglavljima 3.2.3.1. i 3.2.3.2.

Također, tako dobivene otopine razbijenih čestica korištene su i za određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom HPLC analize, kako bi se omogućila usporedba specifičnih polifenolnih spojeva u ekstraktu prije i nakon inkapsulacije.

Postotak inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta izračunat je kao omjer udjela ukupnih polifenola ili hidroksicimetnih kiselina, kao i antioksidacijskog kapaciteta, u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih spojeva u početnim otopinama sustava nosača u ekstraktu maslačka, korištenih za inkapsulaciju.

#### 3.2.6.4 *Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz inkapsuliranih čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima*

Otpuštanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola i udjela hidroksicimetnih kiselina te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH i ABTS metoda (opisano u poglavljima 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3.1. i 3.2.3.2.). SGF se sastojao od natrijevog klorida i klorovodične kiseline (pH=1,2), dok je SIF odgovarao fosfatnom puferu (pH=7,4). Formulirane čestice izdvojene su iz otopine za geliranje te je približno 0,6 g profiltriranih čestica suspendirano u 30 mL SGF-a. Čestice u SGF-u konstatno su miješane na magnetskoj mješalici (podešenoj na 100 rpm), na temperaturi od 37 °C. U određenim vremenskim razmacima iz otopine je izuzimano 2 mL tekućeg medija do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 h te je nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama dodan alikvot od 2 mL SGF-a. Čestice su zatim uklonjene iz otopine SGF-a filtriranjem i prenesene u 30 mL SIF-a (37 °C) te konstantno miješane na magnetskoj mješalici. Postupak uzorkovanja alikvota tekućeg medija je ponovljen u određenim vremenskim razmacima na prethodno opisani način. U ovako dobivenim alikvotima od 2 mL određen je udjel ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline/g čestica, mg kafeinske kiseline/g čestica ili mmol Trolox-a/g čestica. Pomoću dobivenih rezultata određena je kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz ispitivanih sustava nosača s inkapsuliranim ekstraktom lista maslačka.

#### 3.2.6.5. *Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom*

Omjer povećanja mase nastao uslijed vezanja vode (bubrenja) u liofiliziranim česticama praćen je provođenjem *Swelling* metode. 0,05 g liofiliziranih čestica preliveno je s 20 mL destilirane vode te miješano na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. U određenim vremenskim intervalima (na početku, nakon 30 minuta, 1, 2, 4, 6 i 24 sata) izmjerena je masa čestica. Čestice su izvagane na analitičkoj vagi nakon uklanjanja iz tekućeg medija, nakon čega su profiltrirane pomoću lijevka i filter papira te posušene staničevinom. Rezultati su prikazani kao omjer početne mase čestica i mase čestica nakon vezanja vode u određenom vremenskom periodu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Budući da je proizvodnja funkcionalnih prehrambenih proizvoda u današnje vrijeme u stalnom porastu, ovo istraživanje bilo je provedeno s ciljem ispitivanja učinkovitosti različitih prirodnih bipolimera (alginata niske viskoznosti, izolata proteina sirutke, kakaovog praha, rogača i zelene kave i njihovih kombinacija) na svojstva hidrogel mikročestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka (*Taraxacum officinale* L.), u svrhu odabira optimalnog sustava nosača za inkapsulaciju polifenolnog ekstrakta maslačka.

Ekstraktu maslačka određen je bioaktivni profil određivanjem udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijskog kapaciteta DPPH i ABTS metodama (Tablica 5), a zatim određivanjem pojedinačnih polifenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) (Tablica 6).

U svrhu daljnjeg provođenja istraživanja, korišten je 4%-tni i 5%-tni čisti alginat te njihove kombinacije s izolatima proteina sirutke, kakaovim prahom, rogačem i zelenom kavom. Prvotno je ispitan je utjecaj koncentracije alginata na fizikalne i morfološke (veličina, tvrdoća, elastičnost, izgled i boja) karakteristike formuliranih hidrogel čestica (Tablice 7 i 8, Slike 9 i 10), mikrostrukturu čestica (Slike 11 i 12), udjel vode u česticama (Slika 8) te na povećanje mase liofiliziranih čestica (Tablica 10).

Osim toga, određen je i bioaktivni sastav inkapsuliranih čestica, odnosno određen je udjel pojedinačnih polifenola primjenom HPLC-a (Tablica 9) te ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina.

Nadalje, određena je učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH i ABTS metodama (Slike 13–16) te je praćeno otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH i ABTS metoda (Slike 17–20).

U ovom poglavlju dan je prikaz najvažnijih rezultata u obliku grafičkih prikaza (tablica i grafova) i slika te je provedena analiza korelacije između dobivenih rezultata te usporedba rezultata dobivenih ovim istraživanjem s ranije utvrđenim činjenicama, odnosno rezultatima istraživanja drugih autora.

Opis oznaka korištenih sustava nosača, koji se nalaze u grafičkim prikazima rezultata, nalaze se u poglavlju 3.2.5.

#### 4.1. Određivanje bioaktivnog profila ekstrakta maslačka

Tablica 5. Bioaktivni profil ekstrakta lista maslačka

Ukupni polifenoli (mg EGK/g čestica)	Hidroksicimetne kiseline (mg KK/g čestica)	Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/g čestica) [DPPH]	Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/g čestica) [ABTS]
41,76 ± 0,25	20,48 ± 0,18	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,00

U Tablici 5 nalazi se prikaz bioaktivnog profila ekstrakta lista maslačka, odnosno izmjerene vrijednosti udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista maslačka određen primjenom DPPH i ABTS metoda. Izmjereni udjel ukupnih polifenola iznosio je 41,76 mg EGK/g čestica, što je poprilično više od udjela navedenog u istraživanju Ivanova (2014), koji je u ekstraktu lista maslačka prikupljenog s područja Bugarske odredio udjel od 20 mg EGK/g čestica. Mogući razlog ovakve razlike u rezultatima je razlika u godištu i porijeklu lista maslačka korištenog u ova dva istraživanja. Udjel hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu lista maslačka određen ovim istraživanjem iznosio je 20,48 mg KK/g čestica, što je veoma blisko vrijednosti izmjerenoj u istraživanju Ivanova (2014), u kojem je izmjeren udjel hidroksicimetnih kiselina od oko 15 mg KK/g čestica. Nadalje, kao dio ovog istraživanja određen je i antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista maslačka. Kao što je vidljivo iz Tablice 5, vrijednosti određene primjenom obje metode veoma su bliske te iznose 0,16 mmol Trolox-a/g čestica (DPPH) i 0,14 mmol Trolox-a/g čestica (ABTS).

#### 4.2. Određivanje pojedinačnih polifenola ekstrakta maslačka primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) određeni su pojedinačni polifenolni spojevi ekstrakta maslačka. Rezultati u Tablici 6 su izraženi u mg polifenolnog spoja/g biljke.

**Tablica 6.** Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva (mg/g) u ekstraktu lista maslačka

Kemijski spoj	Uzorak
	Ekstrakt maslačka
Klorogenska kiselina (mg/g)	0,39 ± 0,00
Kaftarinska kiselina (mg/g)	2,62 ± 0,02
Kafeinska kiselina (mg/g)	0,04 ± 0,00
Čikorinska kiselina (mg/g)	6,14 ± 0,04
∑DHCK* (mg/g)	0,04 ± 0,00

\*Suma derivata hidroksicimetnih kiselina, izraženih preko kafeinske kiseline

Iz rezultata je vidljivo da je najzastupljeniji polifenolni spoj u ekstraktu lista maslačka čikorinska kiselina, čiji udjel iznosi 6,14 mg/g biljke. Visoki udjel čikorinske kiseline u ekstraktu lista maslačka (od čak 11,95 mg/g) s područja Bugarske odredili su i Ivanov i suradnici (2014). Razlog ovakvoj razlici u određenim udjelima čikorinske kiseline može biti duže vrijeme ekstrakcije u istraživanju Ivanova i suradnika (2014) (60 min naspram 30 min u ovom istraživanju) te različito podrijetlo i godište maslačka. Sljedeća prema zastupljenosti, no s gotovo tri puta manjim udjelom od 2,62 mg/g biljke, je kaftarinska kiselina. Klorogenska i čikorinska kiselina te derivati hidroksicimetnih kiselina zastupljeni su u vrlo malim i približno istim udjelima od 0,39 mg/g (klorogenska) i 0,04 mg/g (kafeinska i derivati hidroksicimetnih kiselina).

### 4.3. Karakterizacija čestica

#### 4.3.1. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika formuliranih čestica

Česticama formuliranima s alginatom (4%-tnim i 5%-tnim) i alginatom u kombinaciji s drugim prirodnim polimerima određeni su parametri veličine, tvrdoće, elastičnosti i boje. Rezultati navedenih ispitivanja prikazani su u Tablicama 7 (parametri veličine, tvrdoće i elastičnosti) i 8 (parametri boje) te na Slici 8 (udjel vode u formuliranim česticama).

#### 4.3.1.1. Određivanje veličine formuliranih čestica

**Tablica 7.** Veličina, tvrdoća i elastičnost hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

Nosáč	4% A		
	Veličina [mm]	Tvrdoća [N]	Elastičnost [mm]
A	1,96 ± 0,10	0,15 ± 0,01	0,29 ± 0,00
A – IPS	2,00 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,30 ± 0,01
A – KP	1,82 ± 0,13	0,10 ± 0,00	0,23 ± 0,00
A – R	1,96 ± 0,14	0,18 ± 0,02	0,31 ± 0,01
A – ZK	2,66 ± 0,16	0,10 ± 0,00	0,22 ± 0,01
Nosáč	5% A		
	Veličina [mm]	Tvrdoća [N]	Elastičnost [mm]
A	2,04 ± 0,16	0,16 ± 0,00	0,32 ± 0,00
A – IPS	2,03 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,30 ± 0,00
A – KP	2,02 ± 0,12	0,20 ± 0,01	0,35 ± 0,01
A – R	2,08 ± 0,10	0,14 ± 0,00	0,31 ± 0,01
A – ZK	2,80 ± 0,11	0,11 ± 0,01	0,27 ± 0,02

U Tablici 7 prikazan je utjecaj različitih koncentracija alginata i dodatka drugih nosača u alginatni matriks gela na parametre veličine, tvrdoće i elastičnosti čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka. Uvidom u rezultate istraživanja, može se zaključiti da povećanje koncentracije alginata kao nosača za inkapsulaciju u pravilu uzrokuje povećanje veličine formuliranih hidrogel čestica. Sukladno tome, upotreba 4%-tnog alginata rezultirala je manjim česticama, gdje su najmanji promjer imale čestice formulirane s 4%-tnim alginatom u kombinaciji s kakaovim prahom ( $1,82 \pm 0,13$  mm), a slijede ih čestice formulirane s čistim 4%-tnim alginatom ( $1,96 \pm 0,10$  mm) i čestice „pojačane“ s rogačem ( $1,96 \pm 0,14$  mm), kojima je izmjerena ista srednja vrijednost promjera (uz nešto veću standardnu devijaciju promjera čestica „pojačanih“ s rogačem). Čestice proizvedene s 4%-tnim alginatom u kombinaciji s izolatima proteina sirutke imale su približno isti promjer ( $2,00 \pm 0,05$  mm) kao čestice proizvedene s čistim 4%-tnim alginatom, dok su najvećeg promjera bile čestice proizvedene s 4%-tnim alginatom u kombinaciji sa zelenom kavom ( $2,66 \pm 0,16$  mm). No, razlog tome je korištenje igle većeg promjera za inkapsulaciju ekstrakta maslačka s alginatom „pojačanim“ zelenom kavom u odnosu na igle korištene za inkapsulaciju drugih sustava nosača, budući da se sami prah mljevenog zrna zelene kave sastojao od velikih, krutih, netopljivih čestica, koje su zahtijevale inkapsulaciju iglom većeg promjera (18 G, 1,2x40 mm), zbog nemogućnosti prolaska tih velikih čestica kroz iglu manjeg promjera (27 G, 0,4x13 mm), korištenu za inkapsulaciju ekstrakta maslačka pomoću drugih sustava nosača. Što se tiče čestica formuliranih s 5%-tnim alginatom kao bazom,

najmanji promjer imale su također čestice proizvedene s 5%-tnim alginatom u kombinaciji s kakaovim prahom ( $2,02 \pm 0,12$  mm), slijede ih čestice „pojačane“ s izolatima proteina sirutke ( $2,03 \pm 0,04$  mm), koje su u slučaju korištenja 5%-tnog alginata nešto manje, nego u slučaju korištenja čistog 5%-tnog alginata ( $2,04 \pm 0,16$  mm), što nije slučaj i kod 4%-tnog alginata. Prema veličini, nakon čistog 5%-tnog alginata slijedi kombinacija istog s rogačem ( $2,08 \pm 0,10$  mm). Čestice formulirane s 5%-tnim alginatom u kombinaciji sa zelenom kavom imale su najveći promjer i u ovome nizu ( $2,80 \pm 0,11$  mm), iz razloga koji je naveden i za čestice formulirane s 4%-tnim alginatom u kombinaciji sa zelenom kavom. Dakle, ako se zanemari parametar veličine čestica formuliranih s alginatom u kombinaciji sa zelenom kavom, većina čestica dobivenih s alginatom „pojačanim“ drugim prirodnim materijalima pokazuje manju srednju vrijednost veličine čestica u odnosu na čestice formulirane s čistim 4%-tnim i 5%-tnim alginatom. Ovakvi rezultati su u skladu s istraživanjem Totosausa i suradnika (2013), koji su dokazali da uključivanje drugih prirodnih materijala za inkapsulaciju rezultira manjom veličinom formuliranih čestica. Istraživanje Belščak-Cvitanović i suradnika (2016) pokazalo je da čestice formulirane s alginatom u kombinaciji s izolatima proteina sirutke imaju manji promjer u odnosu na čestice formulirane s čistim alginatom, kao nosačem za inkapsulaciju, što je u skladu s rezultatima dobivenima za 5%-tni alginat i 5%-tni alginat u kombinaciji s izolatima proteina sirutke u ovom istraživanju. Još jedno istraživanje Belščak-Cvitanović i suradnika (2015) dokazalo je da čestice s inkapsuliranim kafeinom, formulirane s alginatom u kombinaciji s pektinom i kitozonom, imaju manji promjer od čestica formuliranih s čistim alginatom.

#### *4.3.1.2. Određivanje teksture formuliranih čestica*

Čestice pripravljene s nižom koncentracijom alginata (4%) imale su nešto nižu srednju vrijednost tvrdoće, kao što je vidljivo iz Tablice 7. U slučaju 4%-tnog alginata, najveći je utrošak sile (N) za kompresiju čestica bilo potrebno uložiti u slučaju alginata u kombinaciji s rogačem ( $0,18 \pm 0,02$  N) i izolatima proteina sirutke ( $0,17 \pm 0,01$  N), što dokazuje da je korištenje navedena dva materijala rezultiralo stvaranjem dodatnog čvrstog omotača oko čestice, a najmanju u slučaju 4%-tnog alginata u kombinaciji s kakaovim prahom i zelenom kavom ( $0,10 \pm 0,00$  N). Tvrdoća čestica inkapsuliranih čistim 4%-tnim alginatom iznosila je  $0,15 \pm 0,01$  N. U slučaju korištenja 5%-tnog alginata kao osnovnog nosača, najtvrdje su bile čestice pripravljene u kombinaciji s kakaovim prahom ( $0,20 \pm 0,01$  N) i izolatima proteina sirutke ( $0,16 \pm 0,01$  N), a slijede ih čestice formulirane s čistim alginatom ( $0,16 \pm 0,00$  N). Najmanju su tvrdoću imale čestice formulirane kombinacijom alginata i rogača ( $0,14 \pm 0,00$  N) te alginata i zelene kave ( $0,11 \pm 0,01$  N). Dakle, u slučaju 4%-tnog alginata, upotreba rogača i izolata proteina sirutke u kombinaciji s alginatom rezultirala je povećanjem tvrdoće

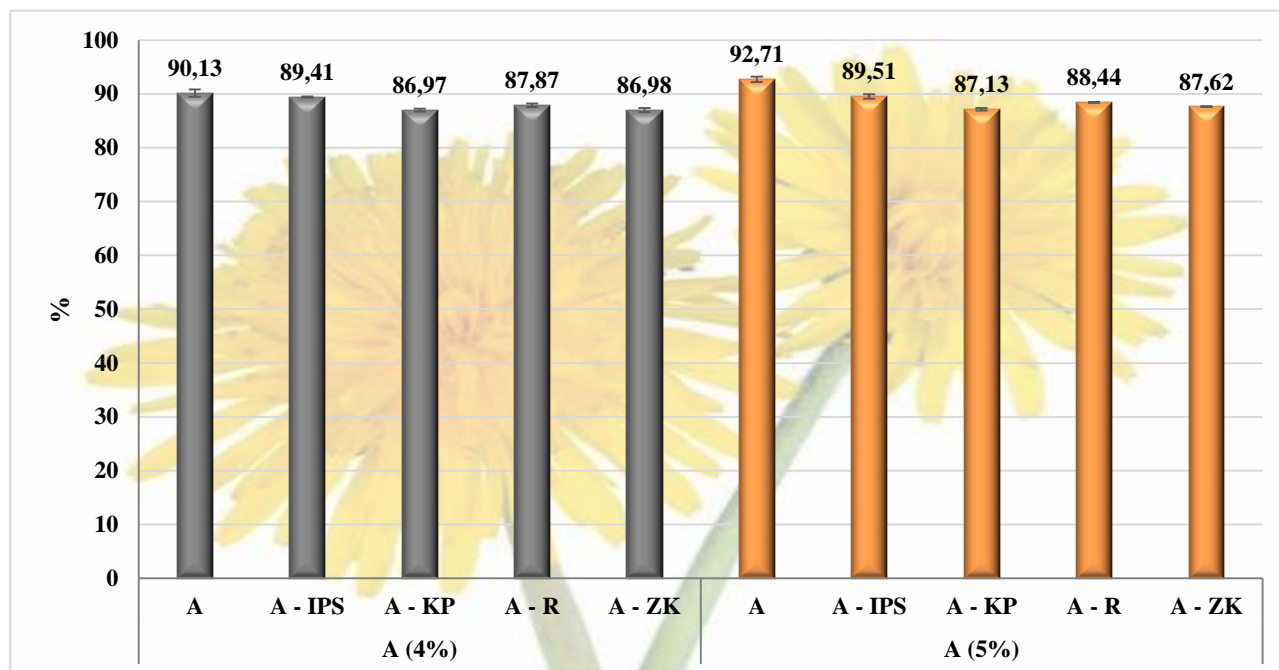


formuliranih čestica u odnosu na čisti alginat, a u slučaju 5%-tnog alginata isti rezultat je dobiven korištenjem kakaovog praha i izolata proteina sirutke. Ovakvi su rezultati u skladu s istraživanjima Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), čiji rezultati pokazuju da korištenje mješavine *Psyllium* ljuskica, pektina, kitozana i karagenana u kombinaciji s alginskom uzrokuje povećanje tvrdoće čestica s inkapsuliranim kafeinom, u odnosu na čestice formulirane s čistim alginskom, i Totosausa i suradnika (2013), koje ukazuje na sposobnost povećanja tvrdoće čestica s inkapsuliranim bakterijama mliječne kiseline u slučaju korištenja alginata u kombinaciji s gelan gumom, u odnosu na čisti alginat. No, kakaov prah i zelena kava, u slučaju 4%-tnog, i rogač i zelena kava, u slučaju 5%-tnog alginata, nisu bili uspješni u povećanju tvrdoće alginatnih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka, budući da je u oba slučaja tvrdoća alginatnih čestica u kombinaciji s navedena dva materijala bila manja od tvrdoće čestica formuliranih s čistim alginskom kao nosačem za inkapsulaciju. Ovakvi su rezultati u skladu s istraživanjem Totosausa i suradnika (2013), čiji rezultati upućuju na činjenicu da smjesa  $\kappa$ -karagenana i gume sjemenki rogača, u slučaju kada se kombinira s alginskom u svrhu formuliranja čestica s inkapsuliranim bakterijama mliječne kiseline, nema sposobnost povećanja tvrdoće čestica u odnosu na one formulirane s čistim alginskom. Dakle, upotreba nekih (dodatnih) materijala u kombinaciji s alginskom može davati izvrsne rezultate na nekim određenim područjima i poboljšavati određene parametre inkapsulacije, no, ne mora nužno optimizirati proces inkapsulacije i fizikalno-kemijske parametre na svim područjima proučavanja.

Što se tiče elastičnosti formuliranih čestica, one pripremljene s 5%-tnim alginskom imaju nešto veću srednju vrijednost elastičnosti (mm) u odnosu na one formulirane s 4%-tnim alginskom kao bazom. U slučaju korištenja 4%-tnog alginata, najmanje su elastične čestice formulirane s alginskom u kombinaciji sa zelenom kavom ( $0,22 \pm 0,01$  mm) i kakaovim prahom ( $0,23 \pm 0,00$  mm), a slijede ih čestice pripremljene s čistim 4%-tnim alginskom ( $0,29 \pm 0,00$  mm) te one pripremljene s alginskom u kombinaciji s izolatima proteina sirutke ( $0,30 \pm 0,01$  mm) i rogačem ( $0,31 \pm 0,01$  mm). Zanimljivo je da čestice pripremljene s 4%-tnim alginskom u kombinaciji s izolatima proteina sirutke i rogačem, koje su se pokazale najtvrdima, odnosno, za njihovu je kompresiju bilo potrebno uložiti najveću silu (N) u nizu čestica formuliranih s 4%-tnim alginskom kao bazom, pokazuju i najveće svojstvo elastičnosti (mm) u istome nizu. Isto tako, čestice pripremljene s 4%-tnim alginskom u kombinaciji s kakaovim prahom i zelenom kavom, koje imaju najmanju tvrdoću, pokazuju najmanje svojstvo elastičnosti u nizu. Dakle, svojstvo elastičnosti čestica formuliranih s 4%-tnim alginskom kao bazom slijedi trend povećanja tvrdoće čestica formuliranih s istom koncentracijom alginata, a koji, od najmanjih do najvećih vrijednosti za oba ispitivana parametra glasi: A-ZK < A-KP < A (4%, čisti) < A-IPS < A-R. Slično je i s česticama pripremljenima s 5%-tnim alginskom kao bazom za formuliranje inkapsulacijskih nosača: sustav A-KP, koji rezultira česticama najveće tvrdoće u nizu,

pokazuje i najjače izraženo svojstvo elastičnosti ( $0,35 \pm 0,01$  mm). Jednako kao i vrijednosti za tvrdoću čestica pripremljenih s čistim 5%-tnim alginatom i sustavom A-IPS, i vrijednosti za elastičnost čestica pripremljenih s navedenim materijalima i kombinacijom materijala veoma su bliske, uz iznimku da čestice pripremljene s čistim 5%-tnim alginatom imaju nešto veću elastičnost ( $0,32 \pm 0,00$  mm) od čestica pripremljenih korištenjem alginata iste koncentracije u kombinaciji s izolatima proteina sirutke ( $0,30 \pm 0,00$  mm). Sustav A-R, čijim korištenjem su dobivene čestice male tvrdoće, pokazuje elastičnost veću ( $0,31 \pm 0,01$  mm) od elastičnosti čestica pripremljenih korištenjem čistog 5%-tnog alginata i alginata u kombinaciji s izolatima proteina sirutke. Elastičnost čestica formuliranih korištenjem 5%-tnog alginata i zelene kave je, kao i tvrdoća istih čestica, najmanja u nizu te iznosi  $0,27 \pm 0,02$  mm. Dakle, čestice pripremljene pomoću sustava nosača A-IPS i A-R, u slučaju 4%-tnog, i sustava nosača A-KP, u slučaju 5%-tnog alginata, pokazuju veće svojstvo elastičnosti u odnosu na čestice s inkapsuliranim ekstraktom maslačka pripremljene korištenjem čistog alginata odgovarajućih koncentracija, dok čestice pripremljene korištenjem ostalih sustava nosača imaju manju elastičnost u odnosu na čestice s čistim alginatom odgovarajućih koncentracija kao inkapsulacijskog nosača. Navedeni rezultati su u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), u kojem su čestice s inkapsuliranim kafeinom, pripremljene korištenjem alginata u kombinaciji s kitozonom, pokazivale veće svojstvo elastičnosti u odnosu na one pripremljene s čistim alginatom, dok su čestice formulirane s alginatom u kombinaciji s mješavinom *Psyllium* ljuskica, karagenana te pektina imale manju elastičnost u odnosu na čestice formulirane s čistim alginatom kao nosačem za inkapsulaciju. Totosaus i suradnici (2013) također su dokazali da upotreba (nekih) dodatnih materijala, poput gelan gume i smjese  $\kappa$ -karagenana i gume sjemenki rogača, može povećati elastičnost formuliranih čestica u odnosu na čestice pripremljene s čistim natrijevim alginatom.

#### 4.3.1.3. Određivanje udjela vode u formuliranim česticama



**Slika 8.** Udjel vode (%) u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

Iz grafičkog prikaza podataka o udjelu vode u formuliranim hidrogel česticama, dobivenih na temelju mase čestica prije i nakon sušenja na 105 °C (Slika 8), vidljivo je da čestice pripravljene s 5%-tnim alginatom kao bazom za formuliranje inkapsulacijskih nosača sadrže nešto veći udjel vode (87,13-92,71%), u odnosu na one formulirane s 4%-tnim alginatom (86,97-90,13%). U oba slučaja, najveći udjel vode sadrže čestice pripravljene s čistim alginatom, a slijede ih sustavi A-IPS (89,41% s 4%-tnim i 89,51% s 5%-tnim alginatom) i A-R (87,87% s 4%-tnim i 88,44% s 5%-tnim alginatom). Najmanji udjel vode sadrže čestice formulirane pomoću sustava nosača A-ZK (86,98% s 4%-tnim i 87,62% s 5%-tnim alginatom) i A-KP (86,97% s 4%-tnim i 87,13 s 5%-tnim alginatom). Dakle, oba niza slijede jednaki trend povećanja udjela vode, koji glasi: A-KP < A-ZK < A-R < A-IPS < A (čisti). U svim hidrogel česticama, dodatak drugih prirodnih materijala rezultirao je smanjenjem udjela vode (i sukladnim povećanjem udjela suhe tvari u česticama), što pokazuje da dodatak drugih biopolimera kao nosača u gel mrežu alginata smanjuje udjel vode u matriksu gela (popunjavajući prostor između čestica), što je u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Ovakvi su rezultati u skladu i s drugim prethodnim istraživanjima, poput onoga Souze i suradnika (2012), koje je dokazalo da se ionskim geliranjem prirodnih biopolimera veže velika količina vode unutar gela te Tella i suradnika (2015), koje je potvrdilo da alginatne mikročestice sadrže visoki udjel vode (94-96%), što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, budući da udjel vode u formuliranim česticama varira od 86,97-92,71%, ukazujući na činjenicu da čestice pripravljene

s biopolimerima kao što je alginat tvore trodimenzionalne hidrofilne veze s visokim kapacitetom za zadržavanje vode. Istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), u kojem je dokazano da se korištenjem izolata proteina sirutke u kombinaciji s alginskom dobivaju hidrogelovi s nešto manjim (78,46%), ali i dalje izrazito visokim udjelom vode u odnosu na čestice pripravljene s čistim alginskom (78,74%), dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Visok udjel vode u česticama pripremljenima s čistim alginskom (95,43%), uz nešto manju vlažnost hidrogelova pripremljenih kombinacijom alginata s drugim materijalima, poput pektina (94,10%) i mješavine *Psyllium* ljuskica (92,27%), je, kao i u ovom, dobiven istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2015).

#### 4.3.1.4. Određivanje parametara boje formuliranih čestica

**Tablica 8.** Parametri boje hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

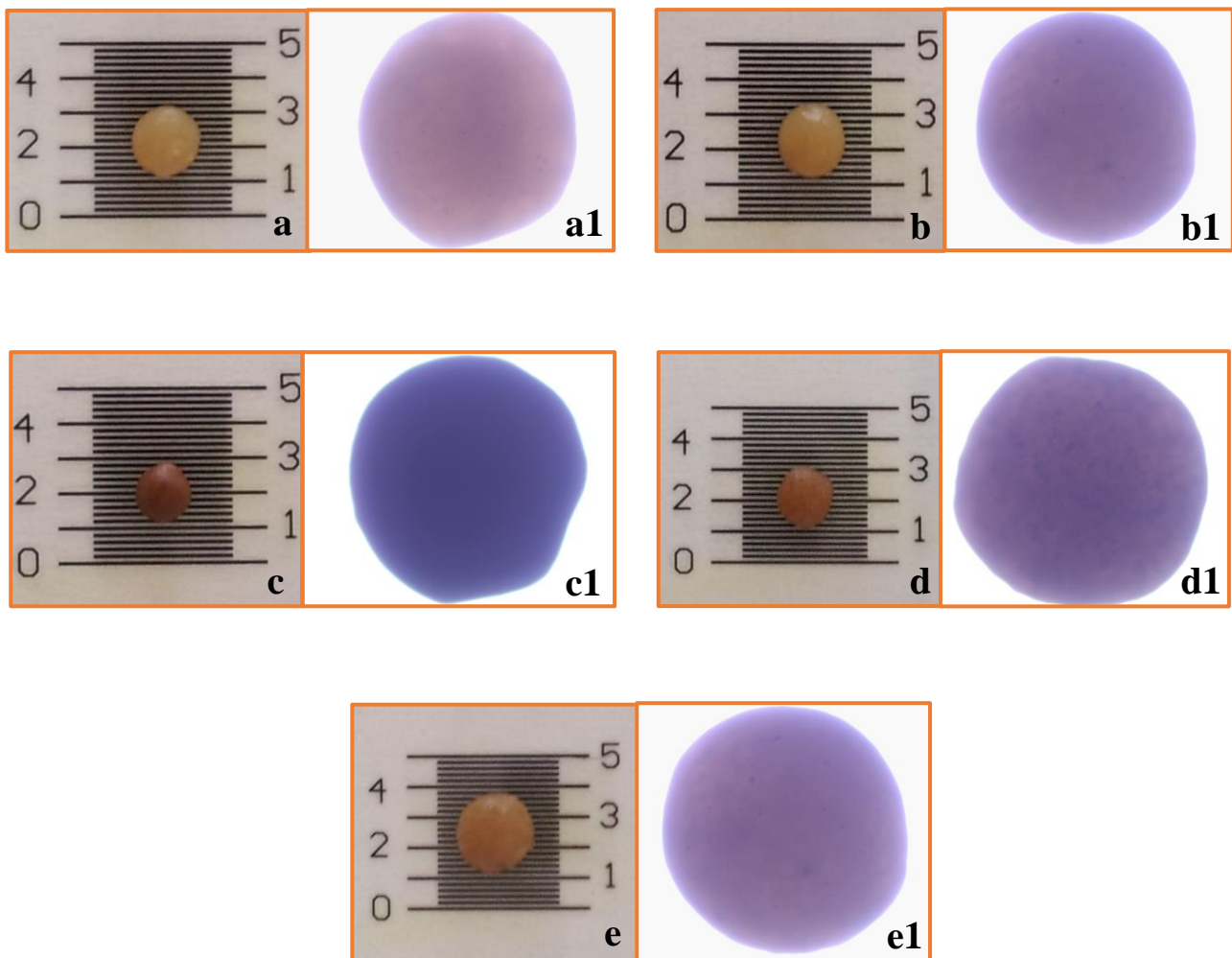
Nosáč	4% A			
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
A	36,59 ± 0,03	5,07 ± 0,00	17,94 ± 0,06	-
A – IPS	35,49 ± 0,01	5,22 ± 0,09	17,43 ± 0,16	1,56 ± 0,24
A – KP	24,62 ± 0,09	10,64 ± 0,03	16,49 ± 0,10	148,36 ± 1,45
A – R	26,41 ± 0,02	6,92 ± 0,03	12,92 ± 0,13	29,71 ± 0,50
A – ZK	31,58 ± 0,03	6,02 ± 0,04	17,61 ± 0,19	49,57 ± 1,14
Nosáč	5% A			
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
A	37,28 ± 0,01	4,59 ± 0,02	16,73 ± 0,09	-
A – IPS	34,40 ± 0,09	5,49 ± 0,02	15,84 ± 0,02	9,90 ± 0,40
A – KP	24,07 ± 0,06	9,08 ± 0,02	13,88 ± 0,07	123,31 ± 1,49
A – R	27,17 ± 0,07	6,82 ± 0,03	12,13 ± 0,11	17,81 ± 0,57
A – ZK	33,06 ± 0,09	5,26 ± 0,00	15,81 ± 0,04	50,67 ± 0,13

Prva presuda o kvaliteti hrane i njezinih sastojaka često ovisi o obilježjima izgleda kao što su boja, površina strukture i oblik, među kojima je boja posebno važno svojstvo (Cardello, 1994). Stoga su česticama pripravljenima mikroinkapsulacijom s čistim 4%-tnim i 5%-tnim alginskom i njihovom kombinacijom s drugim prirodnim materijalima u svrhu formuliranja prirodnih nosača izmjereni parametri boje u SCI (eng. „*Specular Component Included*“) modu. Česticama su izmjerene vrijednosti  $L^*$  (svjetlina),  $a^*$  (parametar boje ispitivanog uzorka – crveno) i  $b^*$  (parametar boje ispitivanog uzorka – žuto) te je onima pripravljenima s 4%-tnim i 5%-tnim alginskom u kombinaciji s izolatima proteina sirutke, kakaovim prahom, rogačem i zelenom kavom izračunata ukupna

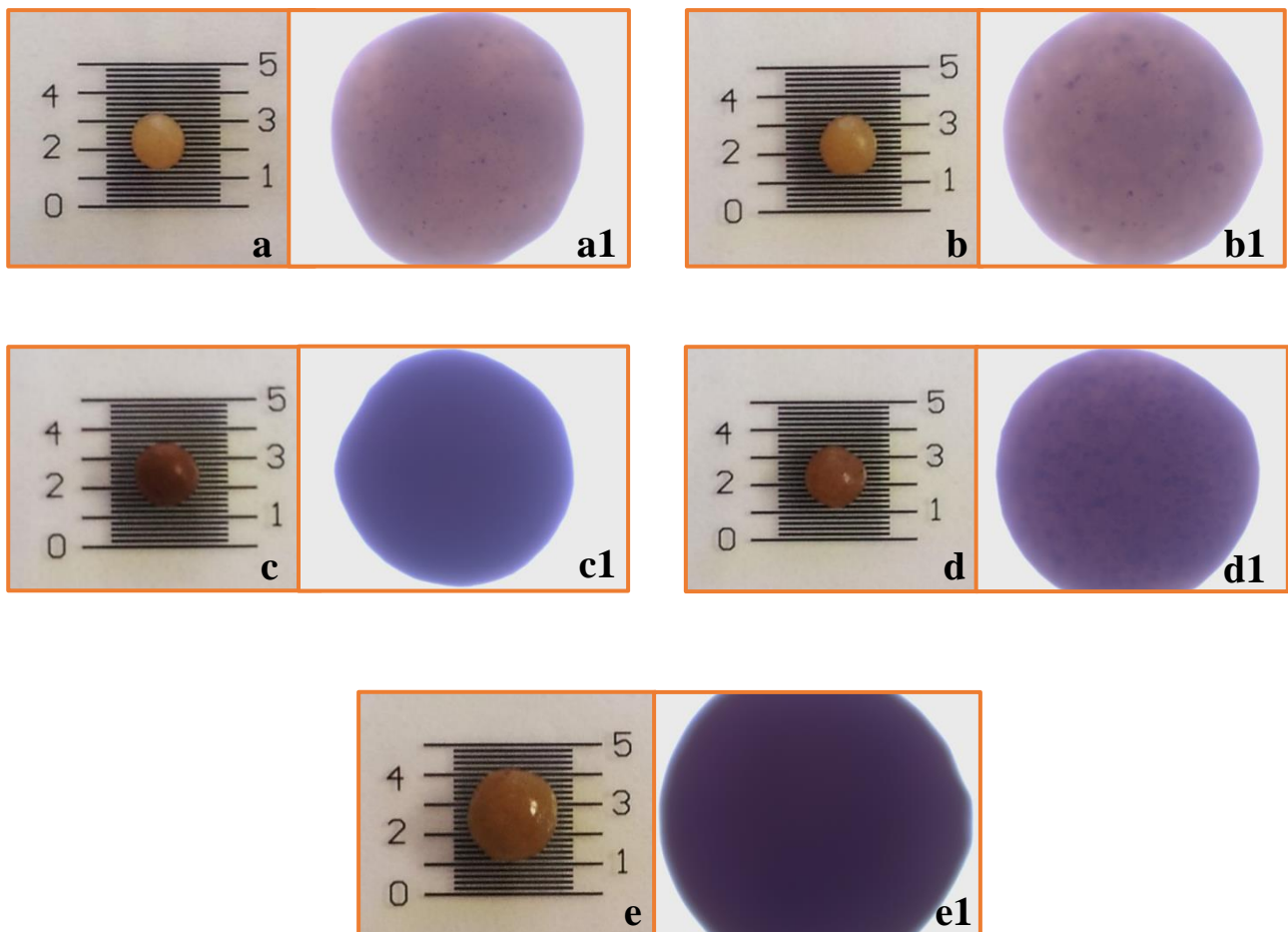
promjena boje  $\Delta E^*$  u odnosu na čestice pripravljene inkapsulacijom s čistim alginatom navedenih koncentracija, prema formuli u poglavlju 3.2.6.1. Rezultati provedenih mjerenja nalaze se u Tablici 8, a uvidom u njih, može se zaključiti da čestice pripravljene s 4%-tnim i 5%-tnim alginatom i njihovim kombinacijama s drugim prirodnim materijalima slijede isti trend: najsvjetlije čestice su one pripravljene s čistim alginatom ( $L^*$  vrijednost iznosi  $36,59 \pm 0,03$  za 4%-tni i  $37,28 \pm 0,01$  za 5%-tni alginat), a slijede ih čestice pripravljene inkapsulacijom sustava A-IPS ( $L^*$  iznosi  $35,49 \pm 0,01$  za 4%-tni i  $34,40 \pm 0,09$  za 5%-tni alginat), A-ZK ( $L^*$  iznosi  $31,58 \pm 0,03$  za 4%-tni i  $33,06 \pm 0,09$  za 5%-tni alginat), A-R ( $L^*$  iznosi  $26,41 \pm 0,02$  za 4%-tni i  $27,17 \pm 0,07$  za 5%-tni alginat) i A-KP ( $L^*$  iznosi  $24,62 \pm 0,09$  za 4%-tni i  $24,07 \pm 0,06$  za 5%-tni alginat). Dakle, čestice pripravljene inkapsulacijom s alginatom u kombinaciji s kakaovim prahom pokazale su se najtamnijima, a one pripravljene s čistim alginatom najsvjetlijima, što je vidljivo i iz fotografskih prikaza u poglavljima 3.2.3. i 4.2.2.1. Isto tako, najveću promjenu boje u odnosu na čestice pripravljene s čistim 4%-tnim i 5%-tnim alginatom u oba slučaja pokazale su čestice pripravljene s alginatom u kombinaciji s kakaovim prahom ( $\Delta E^*$  iznosi  $148,36 \pm 1,45$  za 4%-tni i  $123,31 \pm 1,49$  za 5%-tni alginat), a slijede ih čestice pripravljene sustavom nosača A-ZK ( $\Delta E^*$  iznosi  $49,57 \pm 1,14$  za 4%-tni i  $50,67 \pm 0,13$  za 5%-tni alginat), A-R ( $\Delta E^*$  iznosi  $29,71 \pm 0,50$  za 4%-tni i  $17,81 \pm 0,57$  za 5%-tni alginat) i A-IPS ( $\Delta E^*$  iznosi  $1,56 \pm 0,24$  za 4%-tni i  $9,90 \pm 0,40$  za 5%-tni alginat), koje su najmanje promijenile boju, u odnosu na čestice pripravljene korištenjem čistog alginata kao nosača za inkapsulaciju. Što se tiče  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti, koje upućuju na jačinu izraženosti crvenog ( $a^*$ ) i žutog ( $b^*$ ) obojenja ispitivanog uzorka,  $a^*$  vrijednost je najveća (odnosno, crveno obojenje je najjače izraženo) kod čestica pripravljenih s alginatom (i 4%-tnim i 5%-tnim) u kombinaciji s kakaovim prahom ( $a^*$  iznosi  $10,64 \pm 0,03$  za 4%-tni i  $9,08 \pm 0,02$  za 5%-tni alginat), a  $b^*$  vrijednost je najveća (odnosno, žuto obojenje je najjače izraženo) kod čestica formuliranih pomoću čistog alginata ( $b^*$  iznosi  $17,94 \pm 0,06$  za 4%-tni i  $16,73 \pm 0,09$  za 5%-tni alginat). Slični rezultati dobiveni su istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Naime, u navedenom istraživanju provedena je emulzifikacija u svrhu inkapsulacije ekstrakta maslačka, korištenjem, između ostalog, čistog alginata (2%-tnog) te alginata u kombinaciji s izolatima proteina sirutke (10%, w/v). Formuliranim mikročesticama izmjereni su parametri boje u SCI modu, mjerenjem  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Dobiveni rezultati upućuju na jako male razlike u svjetlini čestica pripravljenih korištenjem čistog alginata i alginata „pojačanog“ izolatima proteina sirutke, kao što je slučaj i u ovome istraživanju. Dakle, najmanja razlika u svjetlini formuliranih čestica prisutna je između čestica pripravljenih s čistim 4%-tnim i 5%-tnim alginatom i sustavima nosača A-IPS pripravljenih s alginatom odgovarajućih koncentracija, što je vidljivo i iz fotografskih prikaza formuliranih čestica u poglavljima 3.2.5. i 4.3.2.1.

### 4.3.2. Određivanje morfoloških karakteristika formuliranih čestica

#### 4.3.2.1. Određivanje oblika i strukture formuliranih čestica



**Slika 9.** Prikazi formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka na kalibracijskoj pločici (a-e) s pripadajućim mikroskopskim slikama (a1-e1), pripremljenih s 4%-tnim alginatom: a – alginat (čisti); b – alginat i izolati proteina sirutke; c – alginat i kakaov prah, d – alginat i rogač; e – alginat i zelena kava



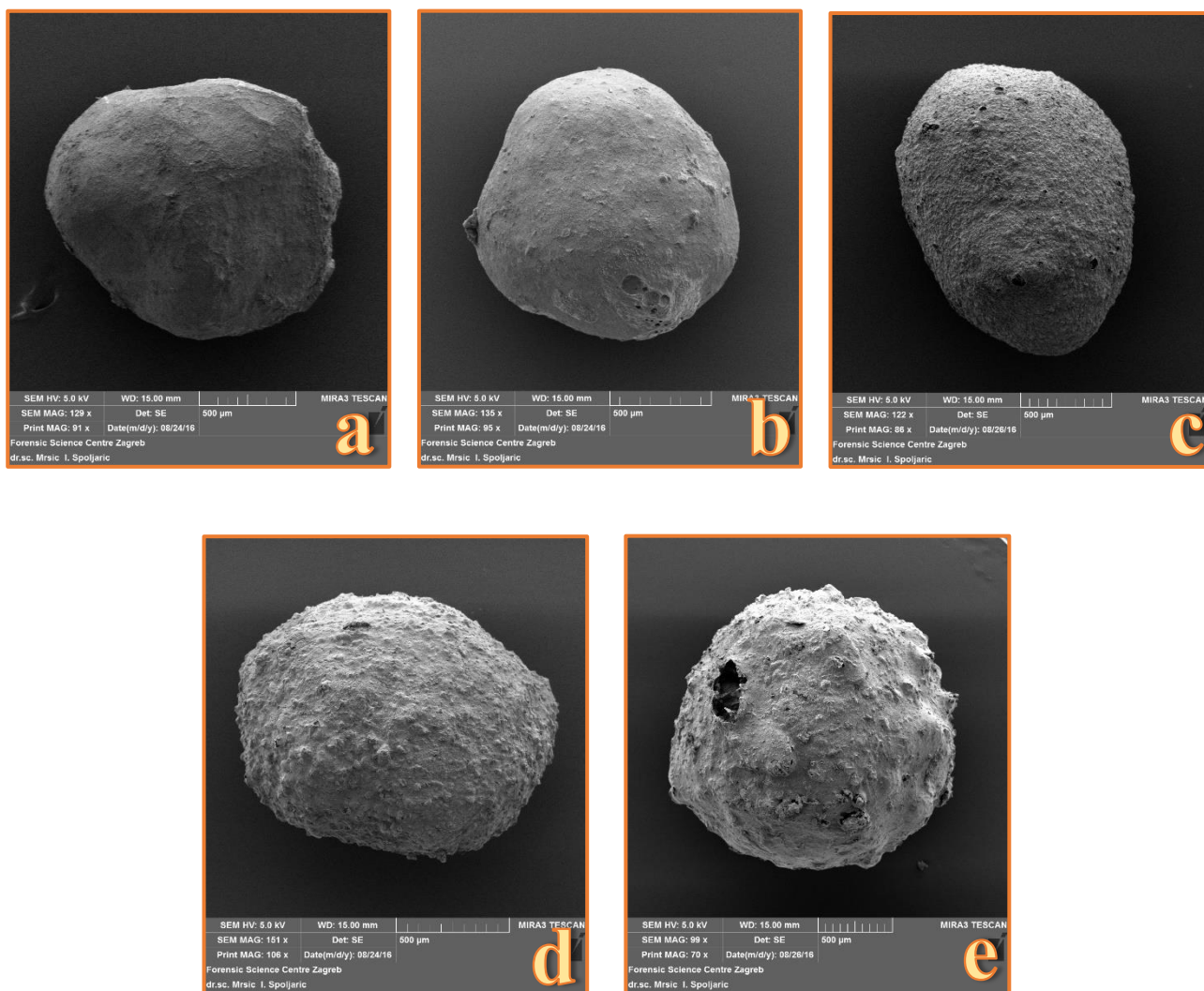
**Slika 10.** Prikazi formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka na kalibracijskoj pločici (a-e) s pripadajućim mikroskopskim slikama (a1-e1), pripremljenih s 5%-tnim alginatom: a – alginat (čisti); b – alginat i izolati proteina sirutke; c - alginat i kakaov prah, d – alginat i rogač; e – alginat i zelena kava

Što se tiče izgleda samih čestica (Slike 9 i 10), najsfერიčnijima su se pokazale čestice formulirane s čistim alginatom kao nosačem za inkapsulaciju. Dobru, iako nešto manju pravilnost oblika u odnosu na čestice formulirane s čistim alginatom, pokazale su i čestice dobivene primjenom alginata (4%-tnog i 5%-tnog) u kombinaciji s izolatima proteina sirutke. Čestice formulirane s 4%-tnim i 5%-tnim alginatom u kombinaciji sa zelenom kavom, koje su ujedno bile i najveće, pokazale su najveća odstupanja u pravilnosti oblika te su čestice ovih sustava varirale od izrazito nepravilnih do izrazito pravilnih, sferičnih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka. Najmanju su pravilnost općenito pokazale čestice formulirane s alginatom u kombinaciji s rogačem i kakaovim prahom, koje su pokazale najveća odstupanja od kuglastog oblika čestica dobivenog primjenom čistog alginata kao materijala za inkapsulaciju. Ovakvi su rezultati u skladu s istraživanjima Belščak-Cvitanović i



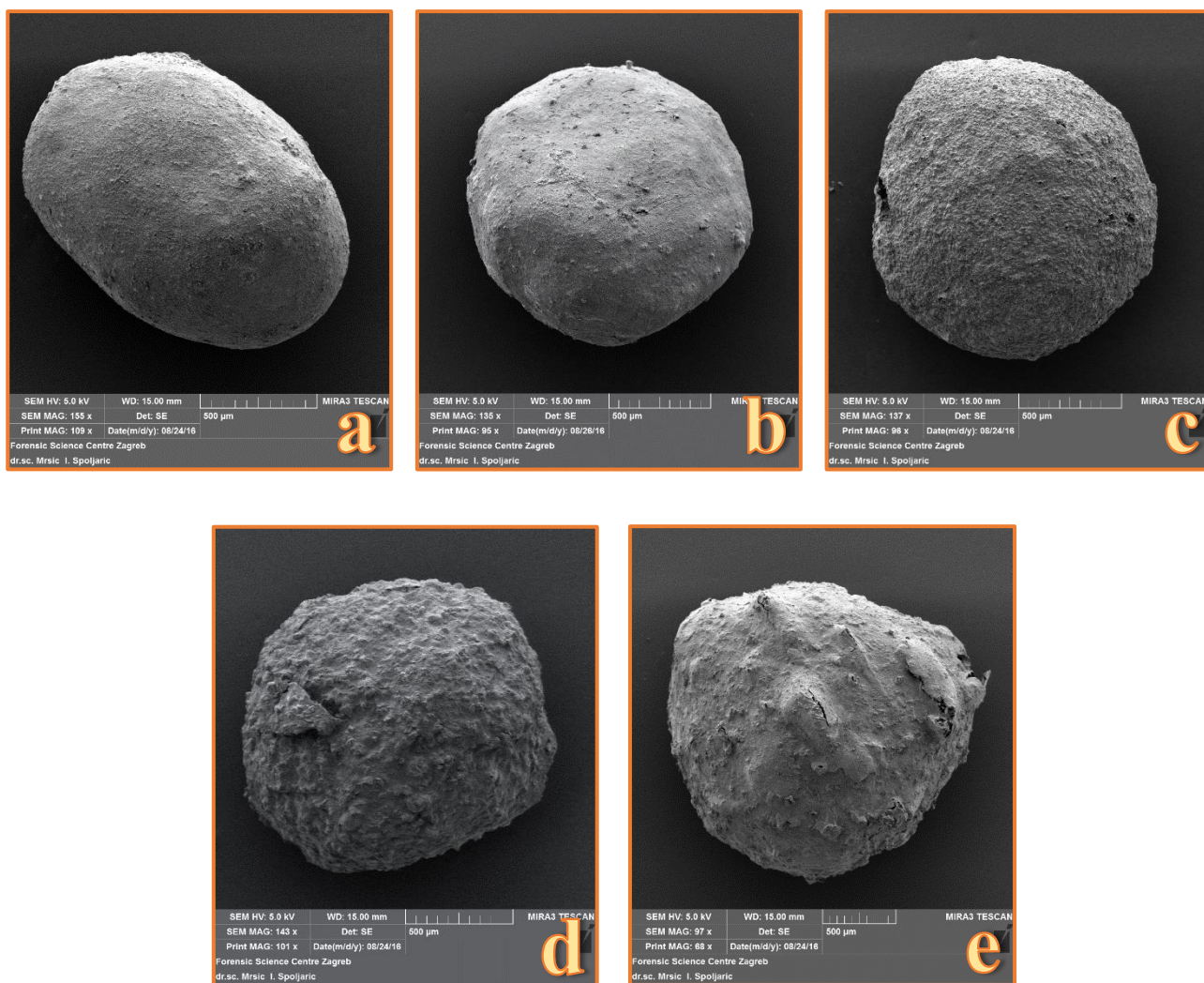
suradnika (2016) i Al-Rousan i suradnika (2007), koji su dokazali da se dodatak drugih materijala u svrhu formiranja binarnih nosača za inkapsulaciju negativno odražava na morfologiju nastalih čestica, smanjujući njihovu sferičnost. Usporedbom izgleda i oblika čestica formuliranih s 4%-tnim i 5%-tnim alginatom i sustavima nosača kreiranim njihovom kombinacijom s drugim prirodnim biopolimerima, vidljivo je da je veća pravilnost i sferičnost formuliranih čestica ostvarena primjenom 5%-tnog alginata kao osnovnog materijala za inkapsulaciju ekstrakta maslačka.

#### 4.3.2.2. Analiza mikrostrukture formuliranih čestica primjenom SEM mikroskopije



**Slika 11.** SEM prikazi formiranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka (a-e), pripremljenih s 4%-tnim alginatom: a – alginat (čisti); b – alginat i izolati proteina sirutke; c – alginat i kakaov prah; d – alginat i rogač; e – alginat i zelena kava





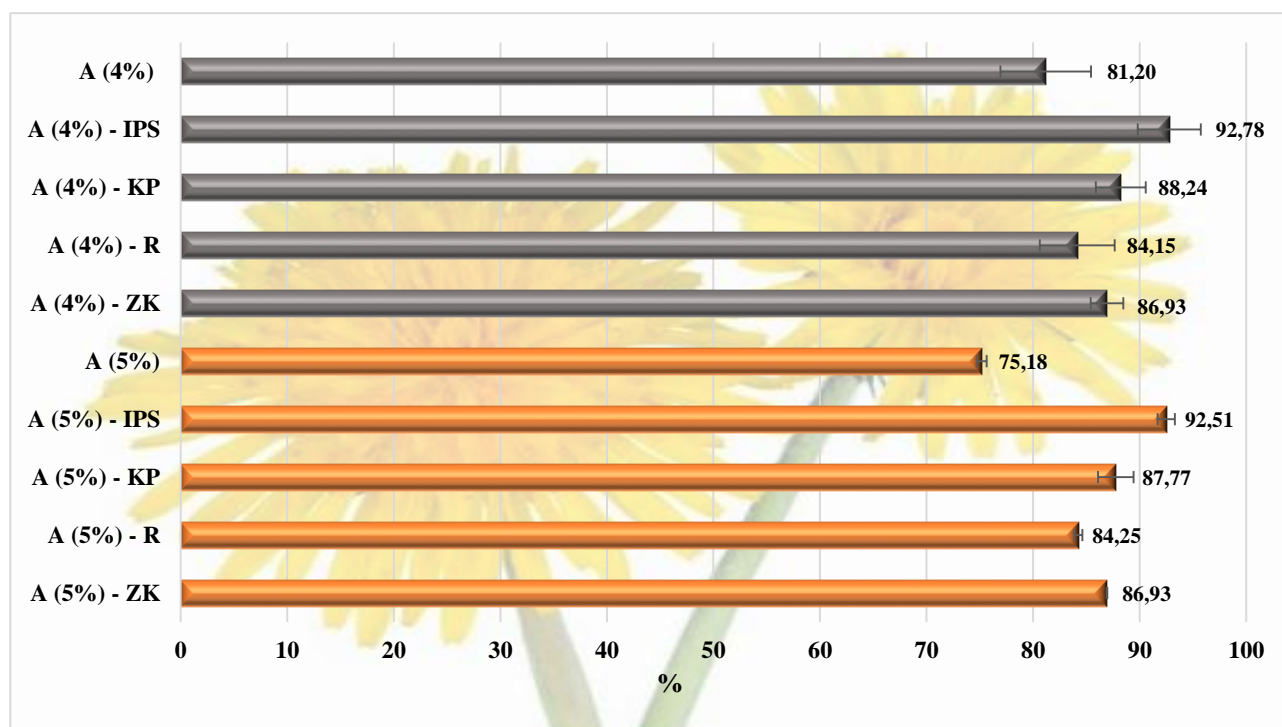
**Slika 12.** SEM prikazi formiranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka (a-e), pripremljenih s 5%-tnim alginatom: a – alginat (čisti); b – alginat i izolati proteina sirutke; c – alginat i kakaov prah; d – alginat i rogač; e – alginat i zelena kava

Slike 11 i 12 prikazuju SEM mikrografove hidrogel čestica pripremljenih s 4%-tnim i 5%-tnim alginatom kao osnovnim materijalom za formuliranje inkapsulacijskih nosača. Kao što je vidljivo iz rezultata, formulirane čestice međusobno se razlikuju prema morfološkim karakteristikama, odnosno površinskoj teksturi. Iako sve čestice, neovisno o vrsti i kombinaciji upotrijebljenog nosača, karakterizira pravilnost i sferičnost (ili lagana ovalnost) oblika, uslijed sušenja liofilizacijom došlo je do „naboravanja“ i pojave poroznosti nekih čestica, baš kao što je zabilježeno i u istraživanjima Fundueanu i suradnika (1999), López Córdoba i suradnika (2013) i Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Slični rezultati zabilježeni su i u istraživanju Zohar-Perez i suradnika (2004), koji su pojavu „propadanja“ stijenki i nastanak poroznih čestica te „skupljanje“

alginatnih čestica unakrsno povezanih s kalcijem uslijed liofilizacije objasnili nastankom tvorevina iz kojih tijekom procesa liofilizacije istječe određena količina vode, što uzrokuje slabljenje gel strukture matriksa čestica. Najpravilnijeg oblika i površine bile su čestice formulirane s čistim alginatom i alginatom u kombinaciji s izolatima proteina sirutke, kao što je određeno i analizom oblika i strukture formuliranih čestica korištenjem optičkog mikroskopa. Prema rezultatima na Slici 12, čestice formulirane s čistim 5%-tnim alginatom pokazale su se nešto manje pravilnima (sferičnima) u odnosu na čestice pripremljene s čistim 4%-tnim alginatom, ali i dalje uz pravilnu, glatku površinu bez većih pora i brazdi. Iako relativno sferične, najnepravilnije i najgrublje površine bile su čestice pripremljene kombinacijom alginata (4%-tnog i 5%-tnog) i rogača, a slijede ih one pripremljene s alginatom (4%-tnim i 5%-tnim) „pojačanim“ kakaovim prahom. Takvu izrazitu nepravilnost površine čestica moguće je pripisati većem udjelu netopljivih dijelova praha rogača i kakaovog praha, ali i većem pritisku prilikom prolaska viskoznijih otopina nosača pripremljenih s navedenim materijalima kroz iglu malog promjera u odnosu na, na primjer, čisti alginat i alginat kombiniran s izolatima proteina sirutke. Izrazito nepravilnu i daleko najporozniju strukturu imale su čestice pripremljene s alginatom (4%-tnim i 5%-tnim) u kombinaciji sa zelenom kavom. Nepravilniju mikrostrukturu hidrogel čestica (u ovom slučaju dobivenih kombinacijom alginata i gelan gume kao nosača za inkapsulaciju bakterija mliječne kiseline), u odnosu na one pripremljene s čistim alginatom, zabilježili su i Chen i suradnici (2006) u svojem istraživanju. Dakle, mikrostruktura formuliranih čestica je, u odnosu na one pripremljene s čistim alginatom kao nosačem za inkapsulaciju, poboljšana jedino upotrebom sustava nosača A-IPS, dok SEM mikrografovi čestica formuliranih korištenjem sustava nosača A-KP, A-R i A-ZK otkrivaju izrazito nepravilnu, poroznu mikrostrukturu tih čestica u odnosu na one pripremljene s čistim alginatom. Ovakvi rezultati su u skladu s onima dobivenima istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), u kojem se kombinacija alginata i izolata proteina sirutke također pokazala optimalnom pri analizi mikrostrukture čestica formuliranih s čistim pektinom i alginatom i njihovim kombinacijama s IPS-om i HPMC-om u svrhu formiranja nosača za inkapsulaciju ekstrakta cvijeta maslačka.

### 4.3.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

#### 4.3.3.1. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola

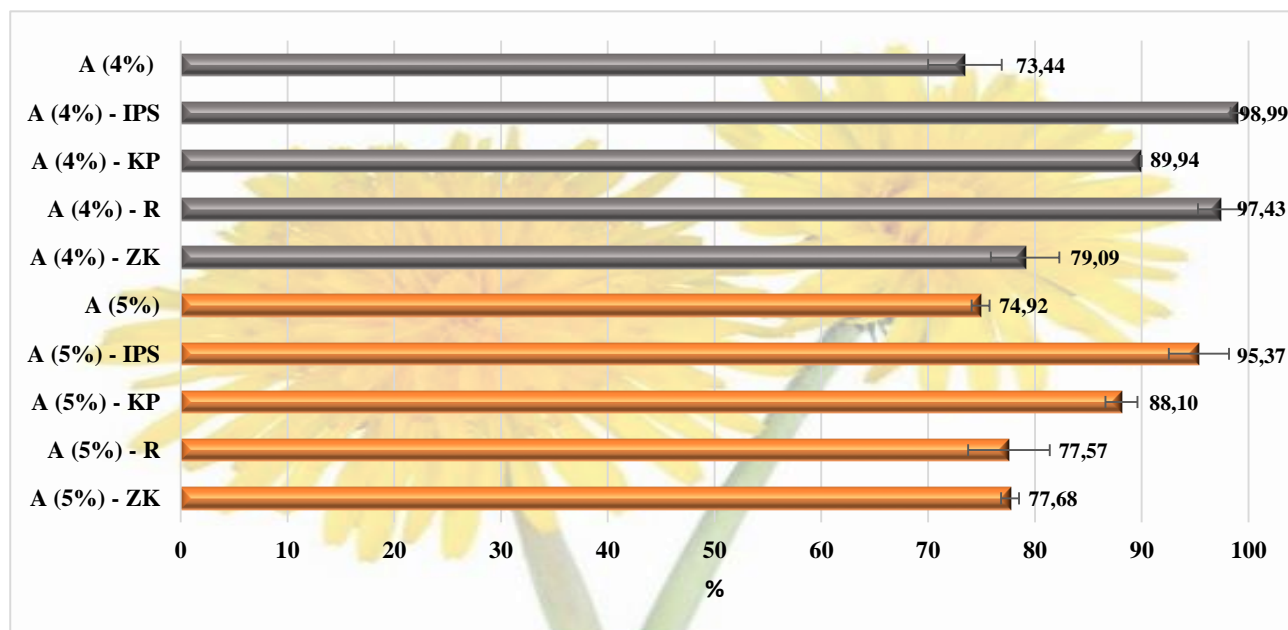


**Slika 13.** Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

Na Slici 13 nalazi se grafički prikaz učinkovitosti inkapsulacije (%) ukupnih polifenola u formuliranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka, iz kojega je vidljivo da su se svi sustavi na bazi alginata, korišteni za mikroinkapsulaciju ekstrakta maslačka korišteni u ovom istraživanju, pokazali veoma učinkovitima, uz visoki stupanj imobilizacije polifenolnih spojeva lista maslačka. Isto je dokazano i rezultatima istraživanja Belščak-Cvitanović i suradnika (2011), u kojemu je inkapsulacijska učinkovitost polifenolnih spojeva različitih biljnih ekstrakata imobiliziranih u sustavu nosača alginat/kitozan iznosila visokih 80,88-89,39%. Osim toga, uvidom u rezultate, može se zaključiti da su svi korišteni binarni sustavi inkapsulacijskih nosača, dobiveni kombiniranjem 4%-tnog i 5%-tnog alginata s drugim prirodnim materijalima, bili učinkovitiji u inkapsulaciji polifenolnih spojeva lista maslačka od „čistog“ alginata navedenih koncentracija, što je u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), u kojemu su sustavi nosača dobiveni kombinacijom alginata i drugih prirodnih materijala (mješavine *Psyllium* ljuskica, pektina, kitozana i karaganena) u svrhu imobilizacije kafeina također pokazali veću inkapsulacijsku učinkovitost u odnosu na čisti alginat kao nosač. Slični rezultati dobiveni su i istraživanjem Isailović i suradnika (2012), u kojem je ekstrakt biljke zečjeg trna inkapsuliran korištenjem čistog alginata te njegove kombinacije s inulinom

različitih koncentracija. U slučaju korištenja 4%-tnog alginata kao osnovnog polimera za formulaciju mikročestica, najveću inkapsulacijsku učinkovitost pokazao je sustav A-IPS (92,78%), a slijede ga sustavi A-KP (88,24%), A-ZK (86,93%) i A-R (84,15%), dok se čisti 4%-tni alginat pokazao najmanje učinkovitim za inkapsulaciju u usporedbi s drugim nosačima, ali i dalje uz veoma visoki stupanj inkapsulacijske učinkovitosti od 81,20%. Isti trend, uz nešto niže vrijednosti postotaka inkapsulacijske učinkovitosti, slijede i sustavi formulirani na bazi 5%-tnog alginata, dakle: A-IPS (92,51%) > A-KP (87,77%) > A-ZK (86,93%) > A-R (84,25%) > A (čisti) (75,18%). Dakle, najboljim se sustavom nosača za inkapsulaciju polifenolnih spojeva ekstrakta lista maslačka pokazao onaj dobiven kombinacijom alginata (i to 4%-tnog) i izolata proteina sirutke, što je u skladu s istraživanjima Chena i suradnika (2007), koji su u svojem istraživanju također koristili alginat kombiniran s proteinima sirutke u svrhu formuliranja nosača za imobilizaciju riboflavina te su utvrdili dobru inkapsulacijsku učinkovitost riboflavina s navedenim nosačem, te Déat-Lainéa i suradnika (2012), koji su potvrdili da se veća inkapsulacijska učinkovitost, u ovom slučaju inzulina, može postići korištenjem alginatnih čestica u kombinaciji s izolatima proteinima sirutke, u odnosu na mikročestice formulirane inkapsulacijom pomoću čistog alginata. Isti rezultati dobiveni su i u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), u kojemu je učinkovitost inkapsulacije polifenolnih spojeva ekstrakta maslačka porasla korištenjem alginata kombiniranog s izolatima proteina sirutke u odnosu na čisti alginat kao nosač za inkapsulaciju.

#### 4.3.3.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina

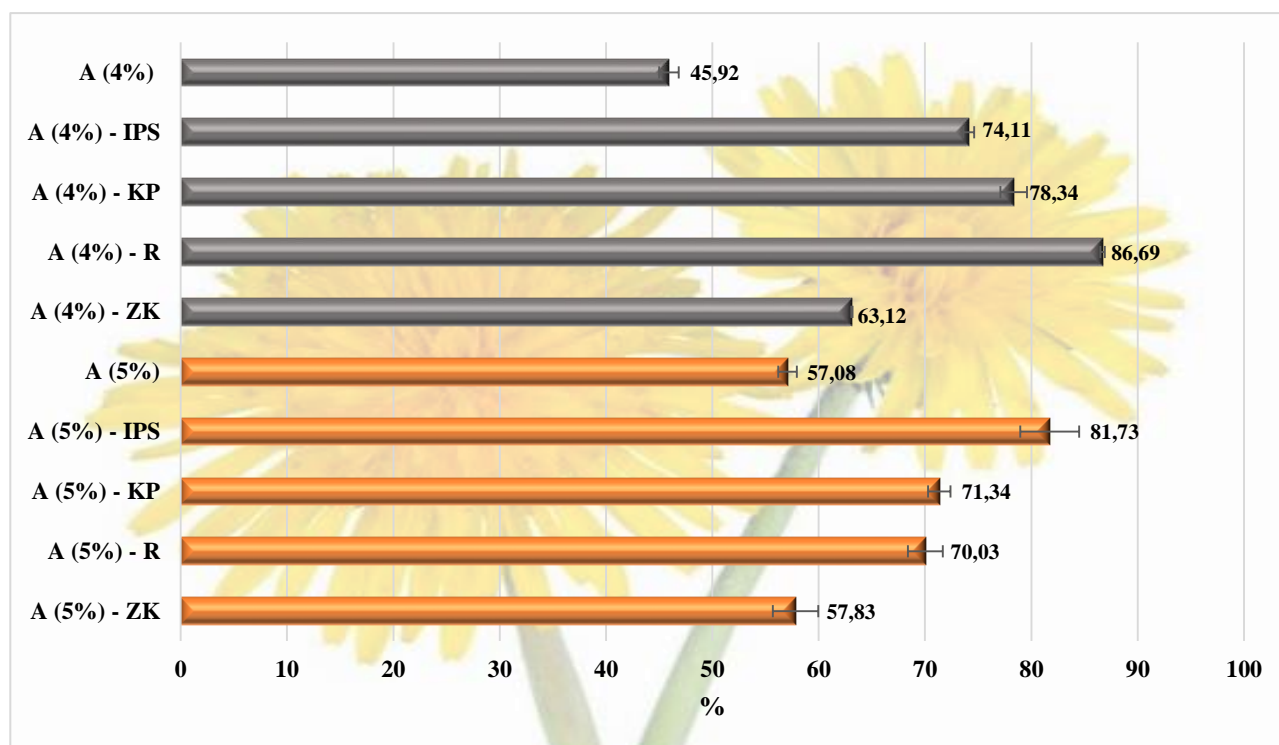


**Slika 14.** Učinkovitost inkapsulacije (%) hidroksicimetnih kiselina u formuliranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

Slika 14 prikazuje učinkovitost inkapsulacije (%) hidroksicimetnih kiselina u česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka. Iz rezultata je vidljivo da su se, kao i u slučaju učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola, svi korišteni nosači pokazali učinkovitima za inkapsulaciju hidroksicimetnih kiselina, uz visoki stupanj inkapsulacije navedenog bioaktivnog spoja. Također, binarni sustavi nosača, dobiveni kombinacijom alginata bili su učinkovitiji u inkapsulaciji hidroksicimetnih kiselina od čistog alginata, što je u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), u kojem je ispitivana inkapsulacijska učinkovitost hidroksicimetnih kiselina ekstrakta cvijeta maslačka u česticama formuliranim korištenjem čistog alginata i alginata u kombinaciji s pektinom i izolatima proteina sirutke. U slučaju korištenja 4%-tnog alginata, najveći stupanj inkapsulacije ponovno je pokazao sustav nosača A-IPS (98,99%), zatim sustav A-R (97,43%), sustav A-KP (89,94%), sustav A-ZK (79,09%) te naposljetku čisti alginat (73,44%). Isti trend ne slijede i sustavi nosača formulirani na bazi 5%-tnog alginata, budući da su u tom slučaju sustavi A-KP i A-ZK pokazali veću inkapsulacijsku učinkovitost od sustava A-R, stoga poredak glasi: A-IPS (95,37%) > A-KP (88,10%) > A-ZK (77,68%) > A-R (77,57%) > A (čisti) (74,92%). Dakle, u oba slučaja se sustav A-IPS ponovno pokazao najučinkovitijim nosačem za inkapsulaciju hidroksicimetnih kiselina. Zanimljivo, u slučaju svih korištenih binarnih sustava nosača došlo je do smanjenja inkapsulacijske učinkovitosti povećanjem koncentracije alginata, dok se inkapsulacijska učinkovitost čistog alginata povećanjem koncentracije s 4% na 5% povećala s 73,44% na 74,92%. Što se tiče usporedbe inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, zabilježene su veće vrijednosti učinkovitosti inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina u odnosu na ukupne polifenole za sustave A-IPS, A-KP i A-R u slučaju 4%-tnog i za sustave A-IPS i A-KP u slučaju korištenja 5%-tnog alginata. Ovakav porast stupnja inkapsulacije ukazuje na povećani afinitet hidroksicimetnih kiselina prema navedenim polisaharidnim i proteinskim materijalima korištenima u svrhu formuliranja nosača za inkapsulaciju. Osim toga, ovakvi podaci potvrđuju i moguće kemijske interakcije između pojedinih hidroksicimetnih kiselina i polimernih nosača koji su omogućili njihovu bolju imobilizaciju u matriksu formiranih čestica (Belščak-Cvitanović i sur., 2016). Isto je potvrđeno i istraživanjem Trifković i suradnika (2015), koji su zaključili da prisutnost hidroksilnih skupina hidroksicimetnih kiselina utječe na jačanje kovalentnih i vodikovih interakcija s, u ovome slučaju, amino skupinama kitozana.



#### 4.3.3.3. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

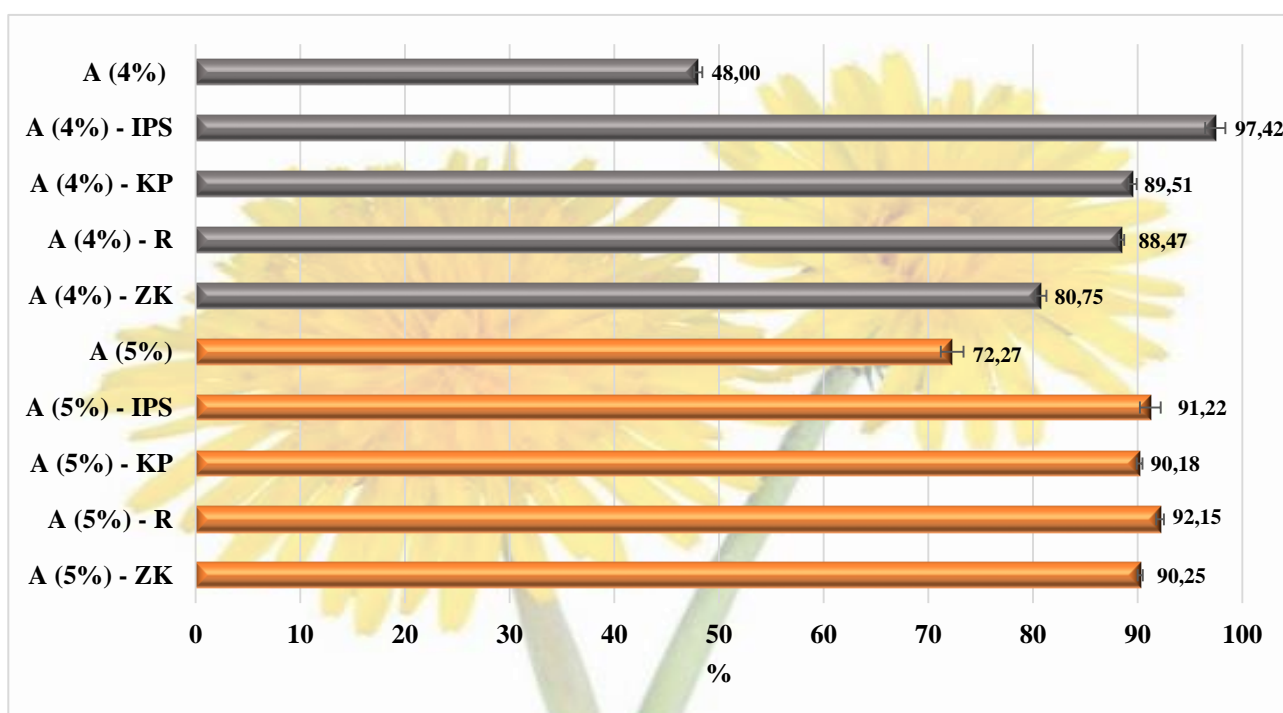


**Slika 15.** Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka, određena je DPPH metodom

U ovom istraživanju provedeno je i određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka DPPH metodom, čiji su rezultati prikazani na Slici 15. Uvidom u rezultate, može se zaključiti da je korištenje binarnih sustava nosača, dobivenih kombinacijom 4%-tnog i 5%-tnog alginata s drugim prirodnim materijalima, dovelo do povećanja učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta korištenjem obje navedene koncentracije alginata, kao osnovnog materijala za formuliranje mikročestica, u odnosu na čisti alginat. Svi sustavi pokazali su se dobrim u zadržavanju antioksidacijskog kapaciteta, sa stupnjem zadržavanja > 50 %. U slučaju korištenja 4%-tnog alginata, najučinkovitijim u zadržavanju antioksidacijskog kapaciteta pokazao se sustav nosača A-R (86,69%), a slijede ga sustavi A-KP (78,34%), A-IPS (74,11%) te A-ZK (63,12%). Korištenjem čistog 4%-tnog alginata došlo je do najmanjeg zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom (45,92%). U slučaju korištenja 5%-tnog alginata kao baze za formuliranje inkapsulacijskih nosača, isti trend nije prisutan. Naime, najveća učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u ovom nizu podataka ostvarena je korištenjem sustava nosača A-IPS (81,73%), zatim A-KP (71,34%), A-R (70,03%) te A-ZK (57,83%). I u ovome slučaju, najmanju učinkovitost zadržavanja kapaciteta antioksidacije imao je čisti alginat, s relativno niskih 57,08%. Navedeni rezultati su u skladu s istraživanjem Belščak-

Cvitanović i suradnika (2016), u kojemu je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom u česticama na bazi alginata s inkapsuliranim ekstraktom maslačka iznosila oko 50% za čisti 2%-tni alginat i oko 75% za alginat „pojačan“ izolatima proteina sirutke. Korištenjem čistog 4%-tnog i 5%-tnog alginata u svrhu formuliranja inkapsulacijskog nosača također su dobivene vrijednosti učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta oko 50%, iz čega se može zaključiti da promjena koncentracije alginata nema prevelikog utjecaja na učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim mikročesticama. To potvrđuje i istraživanje Isailović i suradnika (2012), u kojem je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta korištenjem 1,5%-tnog alginata, kao nosača, iznosila 49%. Navedena vrijednost povećana je korištenjem alginata u kombinaciji s drugim prirodnim materijalima (inulinom različitih koncentracija), baš kao i u ovom istraživanju.

#### 4.3.3.4. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom



**Slika 16.** Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka, određena ABTS metodom

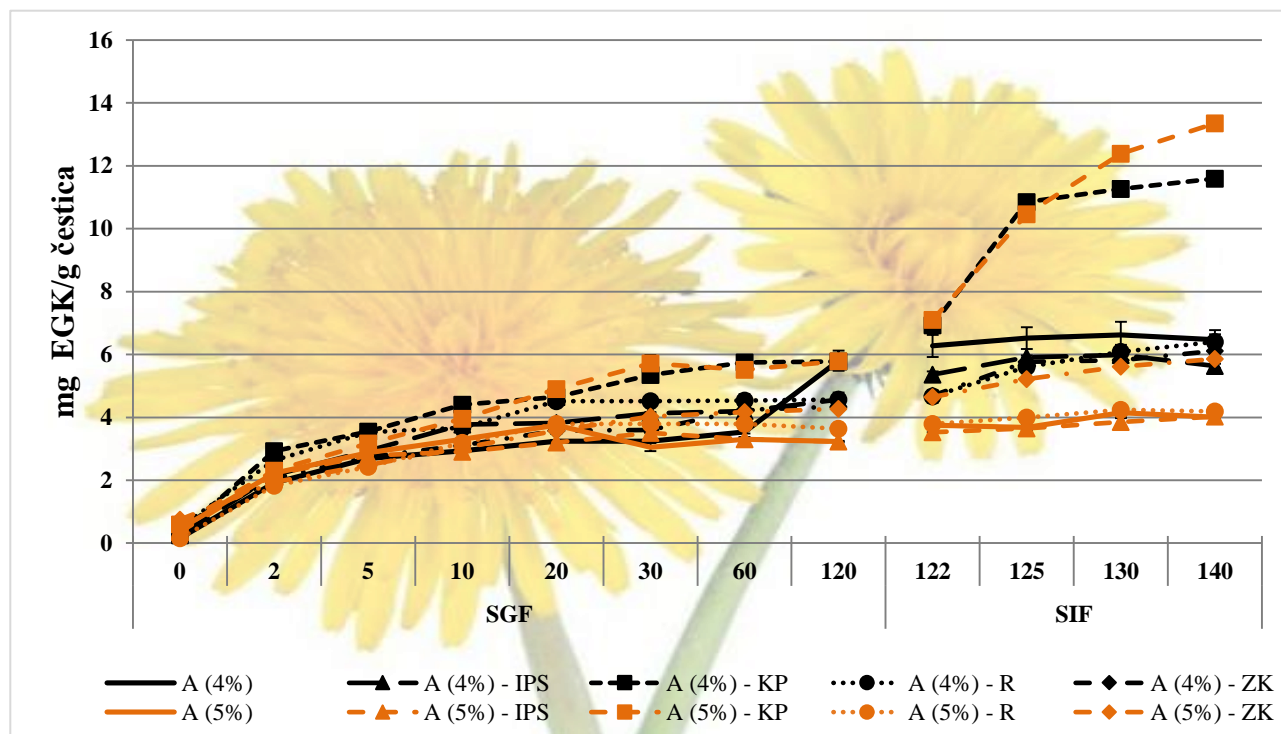
Osim DPPH metodom, kao dio ovog istraživanja provedeno je i određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka ABTS metodom, čiji se rezultati nalaze na Slici 16. Jednako kao i kod određivanja učinkovitosti zadržavanja kapaciteta antioksidacije DPPH metodom, i ovdje je dokazano da

korištenje binarnih sustava nosača s alginatom kao bazom poboljšava učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na čisti alginat kao nosač, što potvrđuju i rezultati istraživanja Isailović i suradnika (2012), u kojem su alginatne čestice s inkapsuliranim ekstraktom biljke zečjeg trna „pojačane“ inulinom različitih koncentracija imale veću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na čestice s čistim alginatom. No, u ovome su slučaju vrijednosti stupnja učinkovitosti nešto veće nego u slučaju određivanja DPPH metodom te su se za sve korištene inkapsulacijske nosače (osim za sustav nosača A-IPS) povećale korištenjem 5%-tnog alginata, kao osnovnog materijala za inkapsulaciju, u odnosu na 4%-tni alginat. Korištenjem 4%-tnog alginata kao osnovnog materijala, najveću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta pokazao je sustav nosača A-IPS s veoma visokih 97,42%, a slijede ga sustavi A-KP (89,51%), A-R (88,47%), A-ZK (80,75%) te naposljetku čisti alginat (48,00%). U slučaju 5%-tnog alginata, najučinkovitijim u zadržavanju antioksidacijskog kapaciteta pokazao se sustav A-R (92,15%) te sustav A-IPS, s nešto nižih 91,22% u odnosu na isti sustav formuliran korištenjem 4%-tnog alginata. Slijede ih sustavi A-ZK (90,25%) i A-KP (90,18%), dok se na zadnjem mjestu prema učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta također nalazi čisti alginat sa 72,27%. Navedene vrijednosti su nešto više od onih dobivenih rezultatima istraživanja Isailović i suradnika (2012), u kojemu je, korištenjem 1,5%-tnog alginata kao nosača za inkapsulaciju ekstrakta biljke zečjeg trna, stupanj učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, određen ABTS metodom, iznosio niskih 30,3%. Uzimajući u obzir tako veliku razliku između stupnja učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta određenog za 4%-tni i 5%-tni alginat u ovom istraživanju i za 1,5%-tni alginat u istraživanju Isailović i suradnika (2012), može se zaključiti da postoji mogućnost utjecaja promjene koncentracije alginata u svrhu formuliranja inkapsulacijskog nosača na promjenu stupnja učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom. Drugim riječima, navedene razlike u rezultatima navedenog i ovog istraživanja i rezultati dobiveni ovim istraživanjem, prikazani na Slici 16, ukazuju na činjenicu da povećanje koncentracije alginata za formuliranje nosača za inkapsulaciju uzrokuje povećanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom.



#### 4.3.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz inkapsuliranih čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

##### 4.3.4.1. Praćenje otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

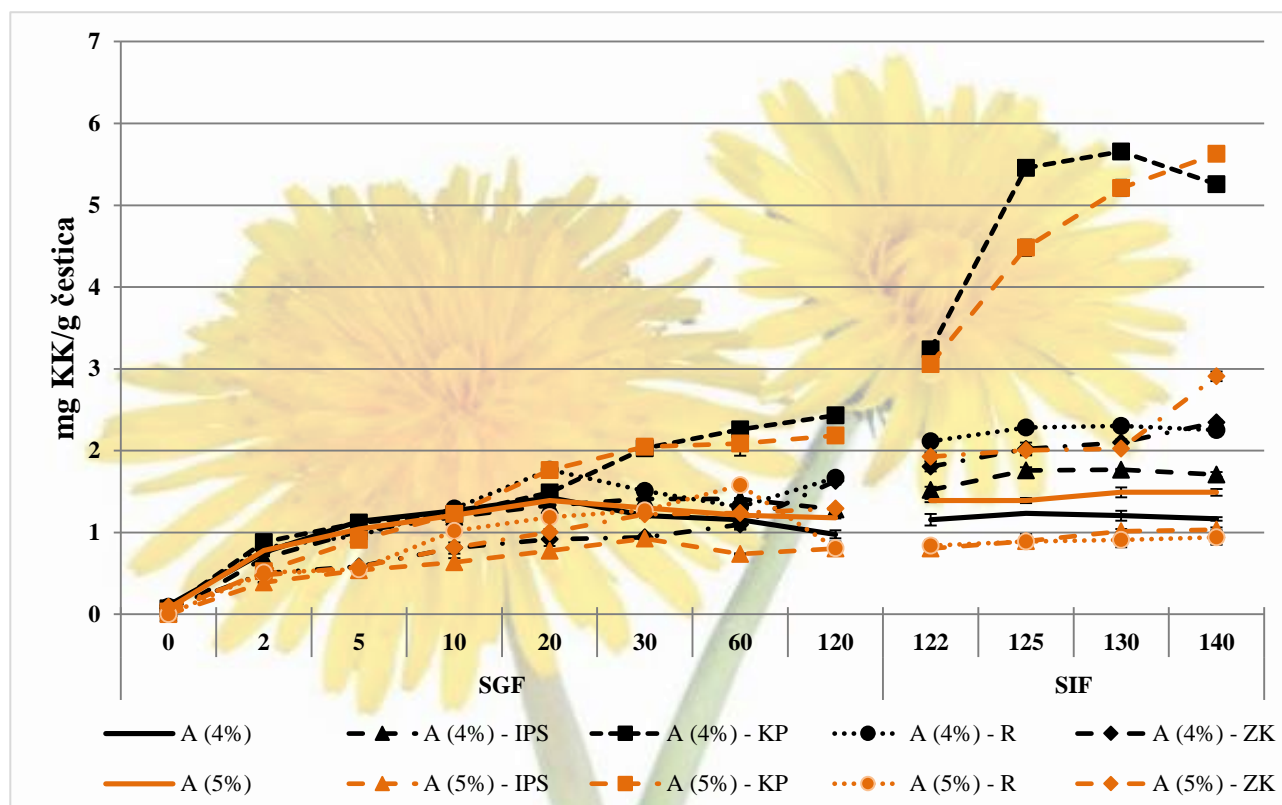


**Slika 17.** Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola (mg EGK/g čestica) iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima

Prikaz kinetike otpuštanja ukupnih polifenola iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka nalazi se na Slici 17, iz koje je vidljivo da su se ukupni polifenoli u simuliranim SGF i SIF fluidima najbrže otpustili iz čestica formuliranih s čistim 4%-tnim alginatom kao nosačem za inkapsulaciju, pri čemu je otpuštanje bilo konstantno do 120. minute u simuliranom SGF fluidu, uz postizanje ravnotežnog stanja u simuliranom SIF fluidu. Primjena dodatnih omotača u kombinaciji s 4%-tnim alginatom rezultirala je sporijim otpuštanjem ukupnih polifenola iz formuliranih čestica tijekom 60 minuta u simuliranom SGF fluidu u odnosu na čisti 4%-tni alginat, što je u skladu s rezultatima istraživanja Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), a što nije bio slučaj i prilikom izlaganja čestica simuliranom SIF fluidu (osim primjenom sustava A(4%)-KP kao nosača za inkapsulaciju ekstrakta maslačka). Do najsporijeg otpuštanja ukupnih polifenola došlo je kod čestica pripremljenih kombinacijom 4%-tnog alginata i kakaovog praha, pri čemu je do kontinuiranog otpuštanja došlo tijekom prvih 60 minuta izlaganja simuliranom gastričnom fluidu (SGF) te je otpuštanje nastavljeno izlaganjem čestica simuliranom intestinalnom fluidu (SIF) tijekom prvih 5 minuta, nakon čega je započelo postizanje ravnotežnog stanja. Slijede ih čestice formulirane s 4%-

tnim alginatom „pojačanim“ rogačem, kod kojih je do otpuštanja ukupnih polifenola dolazilo kontinuirano tijekom prvih 20 minuta izlaganja simuliranom SGF fluidu, nakon čega je došlo do postepenog smanjivanja količine ekvivalenta galne kiseline otpuštenih iz formuliranih čestica, dok je otpuštanje nastavljeno u simuliranom SIF fluidu. Do nešto bržeg otpuštanja ukupnih polifenola dolazilo je iz ekstrakta maslačka inkapsuliranog u sustavu A(4%)-IPS, kod kojeg su se ukupni polifenoli kontinuirano otpuštali tijekom prvih 20 minuta izlaganja čestica simuliranom SGF fluidu, nakon čega je počelo postizanje ravnotežnog stanja te je otpuštanje nastavljeno tijekom prvih 5 minuta u simuliranom SIF fluidu, dok je do najbržeg otpuštanja ukupnih polifenolnih spojeva iz čestica formuliranih kombinacijom 4%-tnog alginata i drugih prirodnih materijala došlo primjenom sustava A(4%)-ZK kao sustava nosača za inkapsulaciju ekstrakta maslačka, kod kojih su se ukupni polifenoli kontinuirano otpuštali tijekom svih 120 minuta izlaganja čestica simuliranom SGF fluidu i 20 minuta izlaganja simuliranom SIF fluidu. Prema rezultatima ovog istraživanja, primjena veće koncentracije (u ovom slučaju 5%) alginata u svrhu formiranja nosača za inkapsulaciju ekstrakta maslačka uzrokovala je pojavu sporijeg otpuštanja ukupnih polifenola iz formuliranih čestica tijekom prvih 20 minuta izlaganja simuliranom SGF fluidu, u odnosu na one pripremljene kombinacijom 5%-tnog alginata s većinom dodatnih prirodnih materijala korištenih u ovom istraživanju. Jedini sustav nosača kod kojega je došlo do sporijeg otpuštanja ukupnih polifenola iz čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka bio je sustav A(5%)-KP, kod kojeg je otpuštanje bilo kontinuirano tijekom prvih 60 minuta izlaganja čestica simuliranom SGF fluidu te je nastavljeno u SIF fluidu, dok je upotreba sustava nosača A(5%)-R, A(5%)-IPS i A(5%)-ZK za inkapsulaciju ekstrakta maslačka rezultirala bržim otpuštanjem ukupnih polifenola iz čestica tijekom prvih 20 minuta u usporedbi s česticama pripremljenima s čistim 5%-tnim alginatom kao nosačem za inkapsulaciju. Ukupni polifenoli kontinuirano su se otpuštali iz čestica formuliranih kombinacijom 5%-tnog alginata i zelene kave tijekom svih 120 minuta izlaganja simuliranom SGF i 20 minuta izlaganja simuliranom SIF fluidu, dok je do otpuštanja iz čestica pripremljenih kombinacijom 5%-tnog alginata i rogača dolazilo u prvih 20 minuta u SGF fluidu, nakon čega je uslijedilo postizanje ravnotežnog stanja do 120. minute u simuliranom gastričnom fluidu te polagani nastavak otpuštanja ukupnih polifenola tijekom prvih 10 minuta izlaganja simuliranom SIF fluidu. Što se tiče kinetike otpuštanja ukupnih polifenola, najslabijim se sustavom nosača od upotrijebljenih pokazao sustav A(5%)-IPS, koji je jedino u vremenu od 30. do 60. minute izlaganja simuliranom SGF fluidu uspio usporiti otpuštanje u odnosu na čisti 5%-tni alginat. Slični su rezultati dobiveni i u istraživanju Isailović i suradnika (2012), gdje je otpuštanje ukupnih polifenola iz čestica s inkapsuliranim ekstraktom biljke zečjeg trna bilo podjednako ili ubrzano iz alginatnih čestica „pojačanih“ inulinom različitih koncentracija, u odnosu na čiste alginatne čestice kao nosače za inkapsulaciju.

#### 4.3.4.2. Praćenje otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

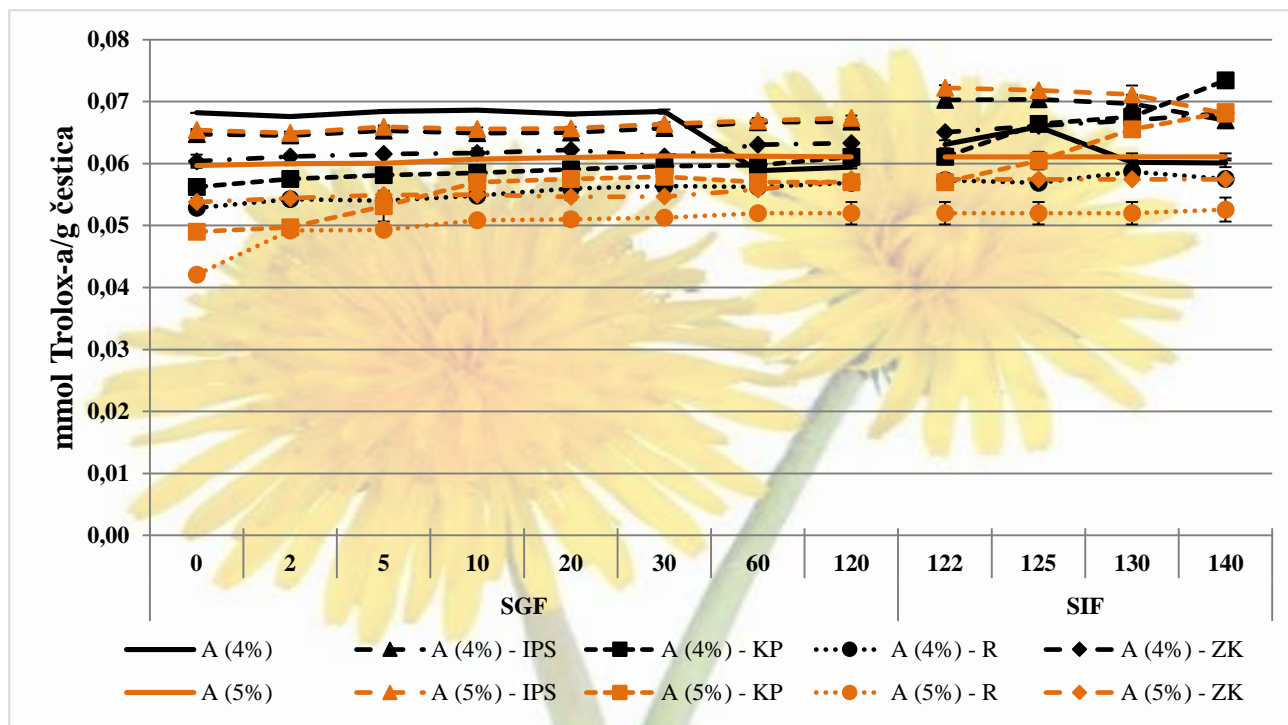


**Slika 18.** Kinetika otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (mg KK/g čestica) iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima

Osim otpuštanja ukupnih polifenola iz formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u simuliranim gastričnim i intestinalnim uvjetima, praćeno je i otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz istih čestica, a rezultati analizirane kinetike otpuštanja nalaze se na Slici 18. Iz rezultata je vidljivo da je otpuštanje bilo podjednako iz čistih alginatnih čestica obje koncentracije (iz kojih je ono bilo kontinuirano do 20. minute izlaganja simuliranom SGF fluidu te je ravnotežno stanje postignuto izlaganjem čestica simuliranim intestinalnim uvjetima) te da je do najsporijeg otpuštanja hidroksicimetnih kiselina došlo izlaganjem čestica sustava A(4%)-KP simuliranom SGF i SIF fluidu, pri čemu je otpuštanje bilo kontinuirano čitavo vrijeme izlaganja SGF fluidu i prvih 10 minuta izlaganja simuliranom SIF fluidu. Zanimljivo, izlaganjem alginatnih čestica „pojačanih“ kakaovim prahom simuliranim intestinalnim uvjetima, došlo je do naglog porasta količine ekvivalenta kafeinske kiseline u otopini, što je zabilježeno i u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), u kojem je praćena kinetika otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz formuliranih alginatnih i pektinskih čestica (u kombinaciji s drugim prirodnim materijalima) s inkapsuliranim ekstraktom maslačka. Poboljšani profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (klorogenske kiseline) iz „pojačanih“ alginatnih čestica, u kombinaciji sa škrobom tapioke, zabilježen je i u istraživanju

Lozano-Vazquez i suradnika (2015). Čestice formulirane kombinacijom 5%-tnog alginata i kakaovog praha također su usporile otpuštanje hidroksicimetnih kiselina u odnosu na čiste 5%-tne alginatne čestice (uz iznimku prvih 10 minuta izlaganja SGF fluidu), uz kontinuirano otpuštanje čitavo vrijeme izlaganja simuliranom SGF i SIF fluidu. Sličnog su profila otpuštanja hidroksicimetnih kiselina bile i čestice formulirane s alginatom različitih koncentracija u kombinaciji sa zelenom kavom, uz kontinuirano otpuštanje svih 120 minuta izlaganja simuliranom SGF fluidu i 20 minuta izlaganja simuliranom SIF fluidu. Što se tiče otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz čestica pripremljenih kombinacijom 4%-tnog alginata i izolata proteina sirutke, ono je bilo kontinuirano prvih 30 minuta izlaganja simuliranim gastričnim uvjetima te je nastavljeno u prvih 5 minuta izlaganja simuliranim intestinalnim uvjetima, dok su se hidroksicimetne kiseline iz čestica formuliranih kombinacijom 5%-tnog alginata i izolata proteina sirutke također kontinuirano otpuštale u prvih 30 minuta izlaganja simuliranom SGF fluidu, no, izlaganjem čestica simuliranom SIF fluidu došlo je do postizanja ravnotežnog stanja. Osim toga, otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz čestica pripremljenih kombinacijom 4%-tnog alginata i izolata proteina sirutke bilo je sporije u odnosu na kinetiku otpuštanja iz čestica formuliranih kombinacijom 5%-tnog alginata i izolata proteina sirutke. Otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz čestica pripremljenih kombinacijom 4%-tnog alginata i rogača bilo je kontinuirano prvih 20 minuta izlaganja simuliranom SGF-u, nakon čega je količina ekvivalenata kafeinske kiseline u otopini naglo pala te se ponovo povećala u vremenu od 60. do 120. minute u SGF-u, uz postizanje ravnotežnog stanja u simuliranim intestinalnim uvjetima. Što se tiče čestica formuliranih kombinacijom 5%-tnog alginata i rogača, hidroksicimetne kiseline su se iz njih kontinuirano otpuštale prvih 60 minuta u simuliranom SGF fluidu, dok je ravnotežno stanje također postignuto izlaganjem čestica simuliranom SIF fluidu. Jednako kao i kod sustava nosača A-IPS, otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz čestica pripremljenih kombinacijom 4%-tnog alginata i rogača bilo je sporije od otpuštanja iz čestica formuliranih kombinacijom 5%-tnog alginata i rogača.

4.3.4.3. Praćenje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima DPPH metodom

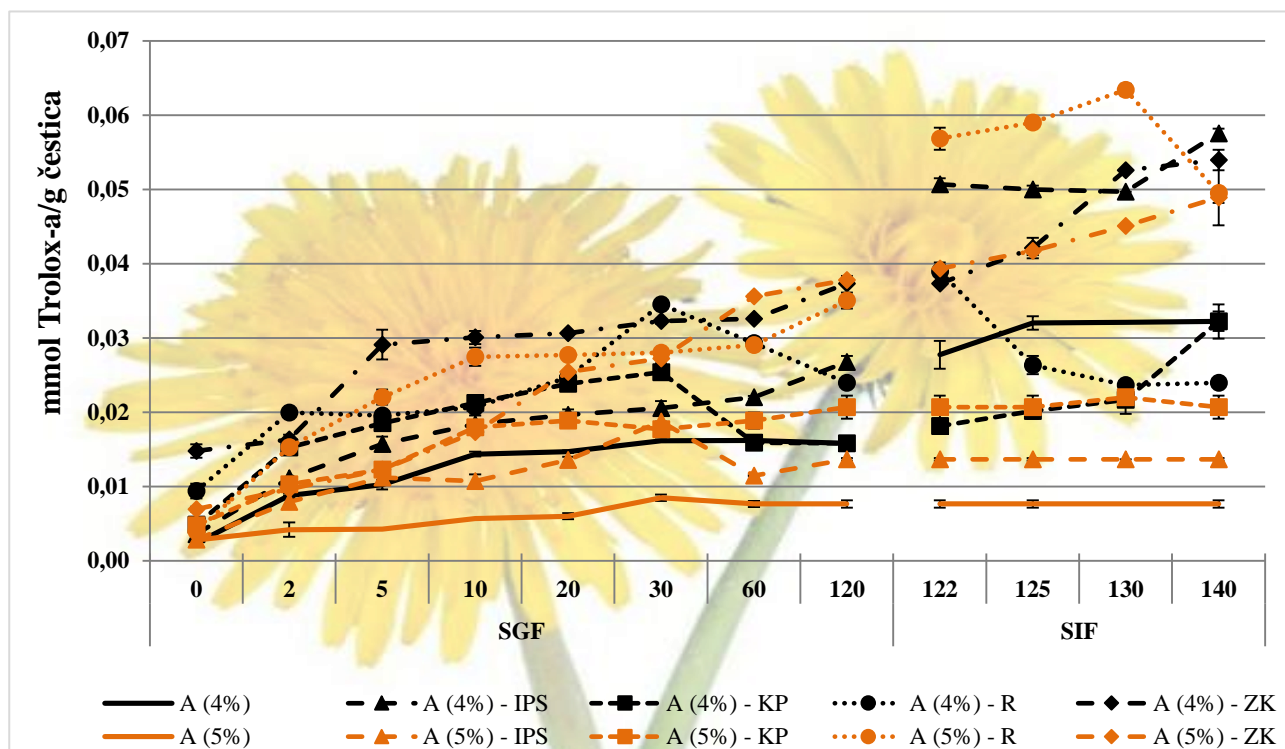


**Slika 19.** Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima, određena DPPH metodom

Slika 19 prikazuje kinetiku otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u simuliranim SGF i SIF fluidima primjenom DPPH metode. Iz rezultata je vidljivo da se, moguće zbog visoke koncentracije alginata primijenjene u istraživanju, antioksidacijski kapacitet najsporije otpuštao iz hidrogel čestica formuliranih s čistim 4%-tnim alginatom kao nosačem za inkapsulaciju. No, kao i kod svih ostalih sustava nosača, ravnotežno stanje nakon izlaganja simuliranim gastičnim uvjetima postignuto je veoma brzo i takvim je održavano do 30. minute te je otpuštanje nastavljeno u prvih 5 minuta izlaganja čestica simuliranim intestinalnim uvjetima. Sve ostale čestice formulirane s 4%-tnim alginatom „pojačanim“ drugim prirodnim materijalima uzrokovale su ubrzanje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na čestice pripremljene korištenjem 4%-tnog alginata (osim sustava A-KP, A-ZK i A-IPS nakon 30. minute izlaganja simuliranom SGF-u). U simuliranim intestinalnim uvjetima, sustav A(4%)-IPS pokazao je sposobnost najsporijeg otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta, uz postizanje ravnotežnog stanja do 10. minute izlaganja simuliranom SIF fluidu. Slijede ga sustavi A(4%)-ZK i A(4%)-KP, pri čemu je otpuštanje iz čestica formuliranih s 4%-tnim alginatom „pojačanim“ kakaovim prahom bilo kontinuirano čitavo vrijeme izlaganja simuliranim intestinalnim uvjetima, dok je izlaganje hidrogel

čestica pripremljenih s 4%-tnim alginatom kombiniranim sa zelenom kavom uzrokovalo postizanje ravnotežnog stanja u istim uvjetima. Čestice formulirane s čistim 4%-tnim alginatom pokazale su sporije otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u simuliranom SIF fluidu od čestica pripremljenih kombinacijom 4%-tnog alginata i rogača, gdje je izlaganjem čestica simuliranim intestinalnim uvjetima došlo do postizanja ravnotežnog stanja. Korištenje čistog 5%-tnog alginata kao nosača za inkapsulaciju ekstrakta maslačka uzrokovalo je ubrzanje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na otpuštanje iz hidrogel čestica formuliranih s čistim 4%-tnim alginatom u simuliranim SGF i SIF fluidima (uz iznimku usporenog otpuštanja u vremenu od 60. do 120. minute u simuliranim gastričnim uvjetima), pri čemu je ravnotežno stanje postignuto ubrzo nakon izlaganja čestica SGF fluidu te je nastavljeno u SIF fluidu. Jedini sustav nosača čijom je primjenom uspješno smanjena brzina otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim SGF i SIF fluidima u odnosu na čestice s čistim 5%-tnim alginatom je onaj formuliran kombiniranjem 5%-tnog alginata s izolatima proteina sirutke, čiji je profil otpuštanja veoma blizak profilu otpuštanja iz čestica sustava nosača A(4%)-IPS. Ovakvi su rezultati u skladu s rezultatima istraživanja Belščak-Cvitanović i suradnika (2016), koji potvrđuju da izlaganje alginatnih hidrogel čestica „pojačanih“ izolatima proteina sirutke simuliranim gastričnim uvjetima uzrokuje smanjenje brzine otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH metode u odnosu na brzinu otpuštanja kapaciteta antioksidacije iz čistih alginatnih čestica. Primjena svih ostalih sustava nosača, pripremljenih kombinacijom 5%-tnog alginata i dodatnih prirodnih materijala, uzrokovala je ubrzanje otpuštanja kapaciteta antioksidacije u simuliranom SGF fluidu u odnosu na „čiste“ 5%-tne alginatne čestice. Što se tiče kinetike otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim intestinalnim uvjetima, usporeno otpuštanje u odnosu na „čiste“ 5%-tne alginatne čestice, osim sustava A(5%)-IPS, pokazale su čestice sustava nosača A(5%)-KP, ali tek nakon 5. minute izlaganja navedenim uvjetima. Osim toga, jedino su čestice ovog sustava pokazale kontinuirano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim intestinalnim uvjetima čitavo vrijeme izlaganja SIF fluidu. Hidrogel čestice pripremljene kombinacijom 5%-tnog alginata i zelene kave te rogača uzrokovale su brže otpuštanje kapaciteta antioksidacije u odnosu na „čiste“ 5%-tne alginatne čestice, pri čemu je i kod jednih i kod drugih zamijećeno postizanje ravnotežnog stanja nakon izlaganja simuliranim intestinalnim uvjetima.

4.3.4.4. Praćenje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima  
ABTS metodom



**Slika 20.** Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima, određena ABTS metodom

Slika 20 prikazuje kinetiku otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima primjenom ABTS metode. Iz rezultata je vidljivo da su svi binarni sustavi nosača formulirani s alginatom kao bazom uspješno usporili otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim uvjetima želuca, u usporedbi s čistim alginatom kao nosačem za inkapsulaciju. Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čistih 4%-tnih alginatnih čestica bilo je kontinuirano u prvih 30 minuta izlaganja čestica simuliranom SGF fluidu, nakon čega je postignuto ravnotežno stanje, koje je nastavljeno i u simuliranim intestinalnim uvjetima. Najveće smanjenje brzine otpuštanja kapaciteta antioksidacije u odnosu na čiste 4%-tne alginatne čestice ostvareno je pomoću 4%-tnog alginata kombiniranog sa zelenom kavom. Naime, iz tih je čestica otpuštanje bilo kontinuirano čitavo vrijeme izlaganja simuliranim SGF i SIF fluidima. Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na „čiste“ 4%-tne alginatne čestice uvelike je usporeno i izlaganjem čestica formuliranih s 4%-tnim alginatom i kakaovim prahom te rogačem simuliranim SGF i SIF fluidima. Do otpuštanja kapaciteta antioksidacije iz čestica formuliranih pomoću navedena dva sustava nosača dolazilo je kontinuirano



u prvih 30 minuta izlaganja simuliranom SGF-u, s tim da je kod sustava nosača A(4%)-KP nastavljeno i u simuliranom SIF-u. Što se tiče otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz čestica pripremljenih kombinacijom 4%-tnog alginata i izolata proteina sirutke, ono je bilo kontinuirano čitavo vrijeme izlaganja čestica simuliranim gastičnim uvjetima te je nastavljeno od 10. do 20. minute izlaganja simuliranim intestinalnim uvjetima. Za razliku od čistih 4%-tnih alginatnih čestica iz kojih je otpuštanje bilo kontinuirano čitavo vrijeme izlaganja simuliranom SGF-u i SIF-u, otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čistih 5%-tnih alginatnih čestica bilo je kontinuirano samo do 30. minute izlaganja simuliranim gastičnim uvjetima, nakon čega je postignuto ravnotežno stanje u SGF-u, ali i u SIF-u. Osim toga, otpuštanje je iz čistih 5%-tnih alginatnih čestica bilo brže u odnosu na otpuštanje iz čistih 4%-tnih alginatnih čestica. Između čestica formuliranih s 5%-tnim alginatom kao osnovnim materijalom za formiranje inkapsulacijskih nosača, najboljima su se pokazale one pripremljene kombinacijom alginata i rogača, iz kojih je otpuštanje bilo najsporije u odnosu na „čiste“ 5%-tne alginatne čestice. Otpuštanje iz navedenih čestica bilo je kontinuirano čitavo vrijeme izlaganja simuliranim gastičnim uvjetima te je nastavljeno u prvih 10 minuta izlaganja simuliranim intestinalnim uvjetima. Usporenu su kinetiku otpuštanja pokazale i čestice formulirane s 5%-tnim alginatom pojačanim zelenom kavom, iz kojih je otpuštanje kapaciteta antioksidacije bilo kontinuirano čitavo vrijeme izlaganja simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Iz čestica formuliranih kombinacijom 5%-tnog alginata i kakaovog praha otpuštanje je bilo kontinuirano prvih 10 minuta izlaganja uvjetima želuca, nakon čega je započelo postizanje ravnotežnog stanja, dok su čestice pripremljene s 5%-tnim alginatom „pojačanim“ izolatima proteina sirutke pokazale najveće „skokove“ prilikom otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta. Naime, otpuštanje iz ovih čestica bilo je kontinuirano u prvih 5 minuta izlaganja simuliranom SGF fluidu, nakon čega je zamijećen pad koncentracije ekvivalenata Trolox-a/g čestica. Otpuštanje je zatim kontinuirano nastavljeno od 10. do 30. minute izlaganja simuliranim uvjetima želuca, nakon čega je opet uslijedio pad koncentracije ekvivalenata Trolox-a/g čestica, da bi se antioksidacijski kapacitet opet počeo kontinuirano otpuštati od 60. do 120. minute izlaganja čestica simuliranom SGF fluidu, uz posljedično postizanje ravnotežnog stanja u simuliranom SIF fluidu.

#### **4.3.5. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva razbijenih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka**

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) određeni su pojedinačni polifenolni spojevi razbijenih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka. Rezultati u Tablici 9 izraženi su u mg polifenolnog spoja/g biljke.



**Tablica 9.** Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva (mg/g) preostao u alginatnim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

Uzorak			Kemijski spoj					
			Klorogenska kiselina (mg/g)	Kaftarinska kiselina (mg/g)	Kafeinska kiselina (mg/g)	Čikorinska kiselina (mg/g)	Kafein (mg/g)**	Teobromin (mg/g)***
Razbijene hidrogel čestice	4% A	Ačisti	0,051 ± 0,001	0,288 ± 0,000	n.d.*	0,629 ± 0,002	-	-
		A-IPS	0,050 ± 0,000	0,268 ± 0,001	n.d.	0,593 ± 0,001	0,056 ± 0,012	-
		A-KP	0,053 ± 0,001	0,255 ± 0,000	n.d.	0,696 ± 0,001	-	0,253 ± 0,001
		A-R	0,051 ± 0,001	0,248 ± 0,001	n.d.	0,619 ± 0,010	-	-
		A-ZK	0,406 ± 0,000	0,262 ± 0,000	n.d.	0,637 ± 0,015	0,179 ± 0,000	-
	5% A	Ačisti	0,048 ± 0,000	0,264 ± 0,001	n.d.	0,532 ± 0,001	-	-
		A-IPS	0,051 ± 0,000	0,257 ± 0,000	n.d.	0,595 ± 0,001	-	-
		A-KP	0,053 ± 0,000	0,254 ± 0,000	n.d.	0,696 ± 0,001	0,062 ± 0,000	0,209 ± 0,000
		A-R	0,059 ± 0,000	0,299 ± 0,001	n.d.	0,904 ± 0,001	-	-
		A-ZK	0,368 ± 0,001	0,248 ± 0,000	n.d.	0,599 ± 0,001	0,217 ± 0,000	-

\* n.d. - nije detektirano

\*\* Potječe iz kakaovog praha i zelene kave

\*\*\* Karakterističan samo za kakaove proizvode, potječe iz kakaovog praha

Iz rezultata je vidljivo da najveći udjel polifenolnih spojeva nakon razbijanja hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka zauzima čikorinska kiselina (0,532 – 0,696 mg/g), koja je karakteristična i za sami ekstrakt lista maslačka, kao što su pokazali i rezultati u Tablici 6. Slijedi je kaftarinska kiselina s rasponom udjela od 0,248 – 0,299 mg/g. Od hidroksicimetnih kiselina, u razbijenim hidrogel česticama najmanje je zastupljena klorogenska kiselina s rasponom od 0,048 – 0,059 mg/g (uz iznimku hidrogel čestica inkapsuliranih pomoću sustava nosača A-ZK, gdje je razbijenim hidrogel česticama određen udjel ove kiseline od čak 0,368 mg/g i 0,406 mg/g), dok kafeinska kiselina nije detektirana niti u jednome od uzoraka. Ovakvi su rezultati u skladu s onima dobivenima istraživanjem Belščak-Cvitanović i sur. (2015), u kojemu je (u razbijenim hidrogel česticama na bazi alginata s inkapsuliranim ekstraktom cvijeta maslačka) čikorinska kiselina također određena u najvećem udjelu, klorogenska u relativno malom, a kafeinska kiselina također nije detektirana. Metilksantini kafein i teobromin određeni su jedino u otopinama razbijenih hidrogel čestica inkapsuliranih pomoću sustava nosača u kojima je njihova prisutnost uobičajena. Dakle, određeni udjel navedenih metilksantina većim se dijelom može pripisati sirovinama korištenima za formuliranje sustava nosača za inkapsulaciju ekstrakta lista maslačka. Tako je kafein, koji, između ostalog, potječe iz kakaovog praha i zrna zelene kave, određen u otopinama hidrogel čestica formuliranih kombinacijom alginata različitih koncentracija s navedena dva prirodna materijala (u udjelima od 0,056 mg/g i 0,062 mg/g kod sustava nosača A-KP i 0,179 mg/g i 0,217 mg/g kod sustava nosača A-ZK), dok je teobromin, karakterističan samo za kakaove proizvode, određen jedino u otopinama hidrogel čestica inkapsuliranih pomoću sustava A-KP, i to u udjelima od 0,209 mg/g i 0,253 mg/g.

#### **4.3.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica *Swelling* metodom**

U Tablici 10 nalazi se prikaz rezultata praćenja povećanja mase (bubrenje) liofiliziranih čestica *Swelling* metodom. Oznaka „SR“ u Tablici označava skraćenicu za eng. „*Swelling ratio*“ (omjer bubrenja), odnosno omjer mase liofiliziranih čestica nakon određenog vremena bubrenja (30 minuta, 1, 2, 4, 6 i 24 sata) u odnosu na početnu masu čestica (0,05 g).

**Tablica 10.** Omjer povećanja mase nastale uslijed bubrenja (vezanja vode) u liofiliziranim česticama

Nosáč	4% A					
	SR <sub>30min</sub>	SR <sub>1h</sub>	SR <sub>2h</sub>	SR <sub>4h</sub>	SR <sub>6h</sub>	SR <sub>24h</sub>
A	1,758 ± 0,003	1,758 ± 0,010	1,787 ± 0,020	1,797 ± 0,017	1,951 ± 0,021	1,826 ± 0,012
A - IPS	1,697 ± 0,008	1,699 ± 0,019	1,729 ± 0,022	1,730 ± 0,029	1,795 ± 0,022	1,797 ± 0,041
A - KP	2,670 ± 0,012	2,793 ± 0,015	2,860 ± 0,003	2,862 ± 0,035	3,112 ± 0,050	3,114 ± 0,035
A - R	2,209 ± 0,006	2,229 ± 0,025	2,269 ± 0,017	2,291 ± 0,028	2,386 ± 0,001	2,483 ± 0,010
A - ZK	2,758 ± 0,013	2,773 ± 0,031	2,775 ± 0,034	2,783 ± 0,050	3,088 ± 0,033	3,893 ± 0,044
Nosáč	5% A					
	SR <sub>30min</sub>	SR <sub>1h</sub>	SR <sub>2h</sub>	SR <sub>4h</sub>	SR <sub>6h</sub>	SR <sub>24h</sub>
A	1,807 ± 0,010	1,811 ± 0,019	1,865 ± 0,007	1,867 ± 0,017	1,867 ± 0,034	1,875 ± 0,052
A - IPS	1,703 ± 0,003	1,705 ± 0,009	1,707 ± 0,001	1,746 ± 0,049	1,746 ± 0,078	1,783 ± 0,004
A - KP	1,875 ± 0,022	1,955 ± 0,030	1,985 ± 0,054	1,989 ± 0,022	2,006 ± 0,038	2,042 ± 0,033
A - R	2,096 ± 0,015	2,113 ± 0,022	2,137 ± 0,029	2,139 ± 0,005	2,152 ± 0,095	2,202 ± 0,067
A - ZK	2,068 ± 0,013	2,153 ± 0,005	2,249 ± 0,067	2,288 ± 0,077	2,292 ± 0,087	2,530 ± 0,078

Uvidom u rezultate praćenja povećanja mase liofiliziranih čestica *Swelling* metodom u Tablici 10, vidljivo je da je korištenje vode kao otapala za liofilizirane čestice značajno utjecalo na promjenu, odnosno povećanje mase čestica, budući da je omjer masa već od 30. minute (prvog vremenskog praćenja povećanja mase) bio > 1 te se postepeno povećavao do krajnje vremenske točke praćenja, odnosno 24. sata. Dakle, moguće je da je mehanizam otpuštanja polifenolnih spojeva, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih mikročestica djelomično ili u potpunosti kontroliran procesom bubrenja, kao što je to opisano u poglavlju 2.3.5. U slučaju korištenja 4%-tnog alginata kao baznog materijala za formuliranje mikročestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka, najveći omjer bubrenja („*Swelling ratio*“ – SR) nakon 24 sata pokazuju čestice pripravljene kombinacijom alginata i zelene kave (3,893 ± 0,044). Slijede ih čestice pripravljene korištenjem alginata u kombinaciji s kakaovim prahom (3,114 ± 0,035), rogačem (2,483 ± 0,010) te čestice pripravljene s čistim 4%-tnim alginatom (1,826 ± 0,012), dok su u navedenom nizu najmanje bubrile čestice formulirane s alginatom „pojačanim“ izolatima proteina sirutke, čiji omjer bubrenja nakon 24 sata iznosi 1,797 ± 0,041. Što se tiče čestica formuliranih s 5%-tnim alginatom kao osnovnim biopolimerom za pripremu mikročestica s inkapsuliranim ekstraktom maslačka, najviše su

također bubrile čestice pripremljene s alginatom u kombinaciji sa zelenom kavom (čiji SR nakon 24 sata iznosi  $2,530 \pm 0,078$ ). Slijede ih čestice dobivene kombinacijom alginata i rogača ( $2,202 \pm 0,067$ ), alginata i kakaovog praha ( $2,042 \pm 0,033$ ) te čestice pripremljene korištenjem čistog 5%-tnog alginata, čiji SR nakon 24 sata bubrenja iznosi  $1,875 \pm 0,052$ . Najmanje su i u ovome nizu podataka nakon 24 sata nabubrile čestice pripremljene s alginatom u kombinaciji s izolatima proteina sirutke, s omjerom bubrenja nakon 24 sata od svega  $1,783 \pm 0,004$ . Dakle, osim što su, uspoređujući SR nakon 24 sata, čestice pripremljene kombiniranjem alginata s kakaovim prahom i rogačem u slučaju korištenja 4%-tnog i 5%-tnog alginata zamijenile mjesto, liofilizirane čestice međusobno prate jednak trend povećanja masa kod obje korištene koncentracije alginata te on glasi: A-ZK > A-KP/A-R > A (čisti) > A-IPS. Iz ovih rezultata da se zaključiti da je proces difuzije ograničavajući čimbenik bubrenja liofiliziranih čestica i brzinu otpuštanja polifenolnih spojeva iz formuliranih čestica. Navedeni rezultati su u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), u kojem su čestice formulirane korištenjem alginata u kombinaciji s drugim biopolimerima (mješavinom *Psyllium* ljuskica, pektinom i karagenanom) u svrhu inkapsulacije kafeina također pokazale veću sposobnost bubrenja, odnosno veći SR nakon 24 sata u odnosu na čestice pripremljene s čistim alginatom, uz iznimku čestica pripremljenih korištenjem alginata kombiniranog s kitozanom, čiji je SR nakon 24 sata bio manji u odnosu na čestice inkapsulirane korištenjem čistog alginata, kao što je slučaj i sa sustavom A-IPS u ovom istraživanju. Uvidom u rezultate mikroskopske analize čestica u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), vidljivo je da čestice formulirane pomoću sustava nosača alginat-karagenan imaju najmanje poroznu strukturu u usporedbi s ostalim korištenim nosačima i sustavima nosača, što se može tvrditi i za sustav nosača A-IPS korišten u ovom istraživanju, temeljem prikaza rezultata mikroskopske analize čestica SEM mikroskopijom (Slike 11 i 12).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakt lista maslačka predstavlja bogati izvor polifenolnih spojeva, posebice hidroksicimetnih kiselina (i to ponajviše čikorinske), što rezultira i smanjenim antioksidacijskim kapacitetom.
2. Povećanje koncentracije alginata s 4% na 5% rezultiralo je povećanjem formuliranih hidrogel čestica te je uzrokovalo formiranje čestica pravilnijeg oblika i elastičnije teksture. Osim toga, baš kao i „jačanje“ alginata većinom drugih prirodnih materijala korištenih u ovom istraživanju, povećanje koncentracije alginata uzrokovalo je povećanje tvrdoće formuliranih čestica.
3. Veća koncentracija alginata uzrokovala je povećanje udjela vode u formuliranim hidrogel česticama. Dodatak drugih nosača u alginatni matriks gela rezultirao je smanjenjem udjela vode u odnosu na udjel vode u hidrogel česticama formuliranima samo s alginatom.
4. Od svih formuliranih hidrogel čestica, najsvjetlije su bile one pripremljene samo s alginatom, a najtamnije one pripremljene kombinacijom alginata i kakaovog praha. U odnosu na hidrogel čestice pripremljene samo s alginatom, najmanje izražena promjena boje uočena je kod čestica formuliranih s alginatom „pojačanim“ izolatima proteina sirutke, dok je ista najviše izražena kod čestica formuliranih s alginatom u kombinaciji s kakaovim prahom.
5. Najsferičniji oblik imale su hidrogel čestice formulirane samo s alginatom, dok je „jačanje“ alginata s drugim prirodnim materijalima rezultiralo smanjenjem sferičnosti formuliranih čestica. Najpravilnijeg oblika i mikrostrukture među česticama pripremljenima kombinacijom alginata i dodatnih nosača, bile su čestice inkapsuliranog ekstrakta maslačka u sustavu nosača A-IPS, a najnepravilnijeg one formulirane sustavima nosača A-KP i A-R.
6. Dodatak drugih prirodnih materijala u alginatni matriks gela rezultirao je povećanjem učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, pri čemu je sustav nosača A-IPS pokazao najveći stupanj inkapsulacije.
7. Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta određena DPPH i ABTS metodom je, u odnosu na inkapsulaciju čistim alginatom, najviše povećana „jačanjem“ alginatnog gela rogačem i izolatima proteina sirutke.
8. Alginatne čestice u kombinaciji s kakaovim prahom imale su najsporiji profil otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te su omogućile njihovo otpuštanje do 140. (ili najmanje 130.) minute zadržavanja u simuliranom gastrointestinalnom fluidu.
9. Najveći omjer povećanja mase („*Swelling ratio*“) nastale uslijed bubrenja (vezanja vode) u liofiliziranim česticama pokazale su čestice formulirane pomoću alginata „pojačanog“ zelenom kavom, a najmanji one pripremljene kombinacijom alginata i izolata proteina sirutke.

## 6. LITERATURA

Al-Rousan, T., Masad, E., Tutumluer, E., Pan, T. (2007) Evaluation of image analysis techniques for quantifying aggregate shape characteristics. *Constr. Build. Mater.* **21**, 978-990.

Amine, K. M., Champagne, C. P., Raymond, Y., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Salmieri, S., Lacroix, M. (2014) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control* **37**, 193–199.

Amsden, B. (1998) Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models, *Macromolecules* **31**, 8382–8395.

Aslani, P., Kennedy, R. A. (2006) Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *J. Control. Release.* **42**, 75–82.

Augustin, M. A. (2001). Functional foods: an adventure in food formulation. *Food Aust.* **53**, 428–432.

Augustin, M. A. (2003) The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Aust. J. Dairy Technol.* **58**(2), 156-160.

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

Barnes, J., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. (1996) Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals, 1. izd., Pharmaceutical Press, London, UK, str. 296.

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  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloid.* **57**, 139-152.

Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hečimović, I., Ježek, D., Bauman, I. (2012) Innovative formulation of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. Leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Res. Int.* **48**, 820-830.

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

- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094-1101.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. (2002) Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *J. Disper. Sci. Technol.* **23**(1–3), 93–123.
- Bodmeier, R., McGinity, J. W. (1988) Solvent selection in the preparation of PLA microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Int. J. Pharm.* **43**, 179–186.
- Boonthekul, T., Kong, H.-J., Mooney, D. J. (2005) Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials.* **26**, 2455–2465.
- Bouhadir, K. H., Lee, K. Y., Alsberg, E., Damm, K. L., Anderson, K. W., Mooney, D.J. (2001) Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnol. Progress.* **17**, 945–950.
- Boury, F., Marchais, H., Proust, J. E., Benoit, J. P. (1997) Bovine serum albumin release from poly(alpha-hydroxy acid) microspheres: Effects of polymer molecular weight and surface properties. *J. Contr. Rel.* **45**, 75–86.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol.* **28**, 25-30.
- Calumpong, H., Maypa, A., Magbanua, M. (1999) Population and alginate yield and quality assessment of four *Sargassum* species in Negros Island, central Philippines. U: Sixteenth International Seaweed Symposium (Kain, J. M., Brown, M. T., Lahaye, M., ured.), Springer, Dordrecht, Nizozemska, str. 211-215.
- Çam, M., İçyer, N. C., Erdogan, F. (2014) Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT Food Sci. Technol.* **55**, 117–123.
- Chatterjee, D., Bhattacharjee, P. (2013) Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: shelf-life and frying stability of soybean oil. *J. Food. Eng.* **117**, 545–550.

- Chen, H. J., Inbaraj, B. S., Chen, B. H. (2012) Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(1), 260-285.
- Chen, L. G., Remondetto, G. E., Subirade, M. (2006) Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 272-283.
- Chen, L., Subirade, M. (2007) Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**(3), 354-362.
- Choi, H. J., Ahn, J., Kim, N. C., Kwak, H. S. (2006) The effects of microencapsulated chitoooligosaccharide on physical and sensory properties of the milk. *Asian Austral. J. Anim.* **19**, 1347–1353.
- Choi, U. K., Lee, O. H., Yim, J. H., Cho, C. W., Rhee, Y. K., Lim, S. I. (2010) Hypolipidemic and antioxidant effects of dandelion (*Taraxacum officinale*) root and leaf on cholesterol-fed rabbits. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 67–78.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. & Augustin, M. A. (2006) Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 2280–2282.
- Cui, S. W. (2005) *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications*, 1. izd., Taylor and Francis, Boca Raton, FL, SAD.
- Daemi, H., Barikani, M. (2012) Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica F.* **19**(6), 2023-2028.
- Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P. E., Chevalier, M., Baumgartner, P. (2007) Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocolloid.* **21**, 953–960.
- Davaatseren, M., Hur, H. J., Yang, H. J., Hwang, J. T., Park, J. H., Kim, H. J. (2013) *Taraxacum officinale* (dandelion) leaf extract alleviates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver. *Food Chem. Toxicol.* **58**, 30–36.
- Davidov-Pardo, G, McClements, D. J. (2015) Nutraceutical delivery systems: resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem.* **167**, 205–212.



- Déat-Lainé, E., Hoffart, V., Garrait, G., Beyssac, E. (2013) Whey protein and alginate hydrogel microparticles for insulin intestinal absorption: evaluation of permeability enhancement properties on Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.* **453**, 336-342.
- de Vos, P., Faas, M. M., Strand, B., Calafiore, R. (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* **27**, 5603–5617.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M. N. (2008) Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr. Polym.* **71**, 126–134.
- Desai, K. G. H., Park H. J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.* **23**, 1361–1394.
- Ding, W. K., Shah, N. P. (2008) Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *Int. Food Res. J.* **15**, 219–232.
- Donati, I., Holtan, S., Mørch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M., Skjak-Braek, G. (2005) New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules* **6**, 1031–1040.
- Dube, A., Ng, K., Nicolazzo, J. A., Larson, I. (2010) Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution. *Food Chem.* **122**, 662–667.
- Duthie, G. G., Pedersen, M. W., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Jenkinson, A. M., McPhail, D. B., Steele, G. M. (1998) The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52**, 733–736.
- Erhatic, R., Vukobratović, M., Dudaš, S., Mužić, M. (2014) Kemijske karakteristike populacija maslačka s križevačkog i riječkog područja. *Agronomski glasnik* **3**, 127-136.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 510-523.
- Fechner, C., Knoth, A., Scherze, I., Muschiolik, G. (2007) Stability and release of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloid.* **21**, 943–951.
- Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M. (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 549–554.

- Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carпов, A., Desbrieres, J., Rinaudo, M. (1999) Physicochemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials* **20**(15), 1427-1435.
- Garcaí-Carrasco, B., Fernandez-Dacosta, R., Dávalos, A., Ordovás, J. M., Rodriguez-Casado, A. (2015) In vitro Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Leaf and Root Extracts of *Taraxacum Officinale*. *Med. Sci.* **3**, 38-54.
- Gasperini, L., Mano, J. F., Reis, R. L. (2014) Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J. R. Soc. Interface.* **11**: 20140817. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>
- Gillette, B. M., Jensen, J. A., Wang, M., Tchao, J., Sia, S.K. (2010) Dynamic hydrogels: switching of 3D microenvironments using two-component naturally derived extracellular matrices. *Adv. Mater.* **22**, 686–691.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., Chan, L.W. (2012) Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polym.* **88**, 1–12.
- Gökmen, V., Sügüt, I. (2007) Computer-vision based analysis of colour as a tool for food process control. U: Focus on food engineering research and development (Pletney, V. N., ured.), Nova Publishers, New York, str. 17-27.
- Gombotz, W. R., Wee, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **31**, 267-285.
- Gomez, C., Rinaudo, M., Villar, M. (2007) Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr. Polym.* **67**, 296–304.
- González-Castejón, M., Visioli, F., Rodriguez-Casado, A. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Int. Life Sci. Inst.* **70**, 534-547.
- Grlić, Lj. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 1. izd., August Cesarec, Zagreb.
- Gryshkov, O., Pogozykh, D., Hofmann, N., Glasmacher, B. (2013) Cell encapsulation into alginate microcapsules provides living cells with a mild environment during cryopreservation. *Cryobiology* **66**, 352.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., Razavi, S. H. (2008) Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem.* **111**, 50–55.

- Hörhammer, L., Wagner, H. (1962) U: Chemistry of Natural and Synthetic Colouring Matters (Gore, T. S., Joshi, B. S., Sunthankar, S. V., Tilak, B. D., ured.), Academic Press, New York, SAD, str. 315.
- Isailović, B., Kalušević, A., Žuržul, N., Coelho, M. T., Đorđević, V., Alves, V. D., Sousa, I., Moldão-Martins, M., Bugarski, B., Nedović, V. A. (2012) Microencapsulation of natural antioxidants from *Pterospartum tridentatum* in different alginate and inulin systems. Proceedings of 6th Central European Congress On Food. CEFood2012, Srbija, str. 1075-1061.
- Ivanov, G. I. (2014) Polyphenols Content and Antioxidant Activity of *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (Dandelion) Leaves. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **6**(4), 889-893.
- Jeyanthi, R., Thanoo, B. C., Metha, R. C., DeLuca, P. P. (1996) Effect of solvent removal technique on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery. *J. Contr. Rel.* **38**, 235–244.
- Jimenez, M., Garcia, H. S., Beristain, C. I. (2008) Sensory evaluation of dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid (CLA). *LWT Food Sci. Technol.* **41**, 1047–1052.
- Jyothi Sri, S., Seethadevi, A., Suria Prabha, K., Muthuprasanna, P., Pavitra, P. (2012) Microencapsulation: a review. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **3**, 509-531.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., Srawan, G. Y. (2010) Microencapsulation techniques, factors influencing Encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* **27**(3), 187-197.
- Kailasapathy, K., Harmstorf, I., Phillips, M. (2008) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT Food Sci. Technol.* **41**, 1317–1322.
- Kanjickal, D. G., Lopina, S. T. (2004) Modeling of drug release from polymeric delivery systems—a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **21**, 345–386.
- Kim, J., Noh, K., Cho, M., Jang, J., Song, Y. (2007) Antioxidative, anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of dandelion (*Taraxacum officinale*) extracts in C57BL/6 mice fed atherogenic diet. *FASEB J.* **21**, 862–867.
- Klahorst, S. J. (2006) Flavour and innovation meet. *World of Food Ingredients* **6**, 26–30.
- Komissarenko, N. F., Derkach, A. I. (1981) *Taraxacum officinale* coumarins. *Khim. Prir. Soedin.* **4**, 519.

- Koushki, M. R., Azizi, M. H., Azizkhani M., Koohy-Kamaly, P. (2015) Effect of Different Formulations on Mechanical and Physical Properties of Calcium Alginate Edible Films. *J. Food Qual. Hazards Control* **2**, 45-50.
- Krasaekoopt, W., Watcharapoka, S. (2014) Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT Food Sci. Technol.* **57**, 761–766.
- Kuo, C. K., Ma, P. X. (2001) Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **22**, 511–521.
- Kwak, N. S., Jukes, D. J. (2001) Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control* **12**, 109–117.
- Langer, R., Peppas, N. A. (2003) Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE J.* **49**(12), 2990-3006.
- Lee, P. K., Richardson, P. H. (2004) Controlled release encapsulated bioactive substances. US 6835397B2.
- Leite, R. A., Lino, A. C. S. & Takahata, Y. (2003) Inclusion compounds between  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins: iron II lactate: a theoretical and experimental study using diffusion coefficients and molecular mechanics. *J. Mol. Struct.* **644**, 49–53.
- Li, X., Deng, X., Yuan, M., Xiong, C., Huang, Z., Zhang, Y., Jia, W. (1999) Investigation on process parameters involved in preparation of polylactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing *Leptospira Interrogans* antigens. *Int. J. Pharm.* **178**, 245–255.
- Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., Xin, Z., Cao, L., Hu, Q. (2011) Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloid. Surface. B.* **82**, 297–301.
- Lim, F., Sun, A. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* **210**, 908–910
- Lin, C. C., Metters, A. T. (2006) Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **58**, 1379-1408.
- López Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M. (2013) Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with *Yerba mate* antioxidants. *Carbohydr. Polym.* **95**, 315-323.

- Lozano-Vazquez, G., Lobato-Calleros, C., Escalona-Buendia, H., Chavez, G., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2015) Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. *Food Hydrocolloid.* **48**, 301-311.
- Malafaya, P. B., Silva, G. A., Reis, R. L. (2007) Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **59**, 207–233.
- Malmo, C., Storia, A. L., Mauriello, G. (2013) Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate souffle. *Food Bioprocess. Technol.* **6**, 795-805.
- Martinsen, A., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O. (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 79–89.
- Masaro, L., Zhu, X. X. (1999) Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Prog. Polym. Sci.* **24**, 731–775.
- Matkowski, A., Tasarz, P., Szypula, E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J. Med. Plants Res.* **2**(11), 321-330.
- Maxwell, S., Cruickshank, A., Thorpe, G. (1994) Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* **344**, 193–194.
- McClements, D., Lesmes, U. (2009) Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci. Tech.* **20**, 448-457.
- Mehta, R. C., Jeyanthi, R., Calis, S., Thanoo, B. C., Burton, K. W., DeLuca, P. P. (1994) Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drugs. *J. Contr. Rel.* **29**, 375–384.
- Mehta, R. C., Thanoo, B. C., DeLuca, P. P. (1996) Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(D,L-lactide-co-glycolide). *J. Contr. Rel.* **41**, 249–257.
- Mohanraj, V. J., Chen, Y. (2006) Nanoparticles-a review. *Trop. J. Pharm. Res.* **5**(1), 561-573.
- Mollet, B., Lacroix, C. (2007) Where biology and technology meet for better nutrition and health. *Curr. Opin. Biotech.* **18**, 154–155.

- Munin, A., Edwards-Lévy (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **3**, 793-829.
- Murua, A., Orive, G., Hernandez, R.M., Pedraz, J.L. (2009) Xenogeneic transplantation of erythropoietin-secreting cells immobilized in microcapsules using transient immunosuppression. *J. Control. Release.* **137**, 174–178.
- Murua, A., Portero, A., Orive, G., Hernandez, R. M., de Castro, M., Pedraz, J. L. (2008) Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J. Control. Release.* **132**, 76–83.
- Muthukumarasamy, P., Holley, R. A. (2007) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **24**, 82–88.
- Muthukumarasamy, P., Holley, R. P. (2006) Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, 164–169.
- Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* **1**, 1806-1815.
- Norton, I. T., Frith, W. J. (2001) Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloid.* **15**(4–6), 543–553.
- Olivas, G. I., Barbosa-Canovas, G. V. (2008) Alginate-calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT- Food Sci. Technol.* **41**, 359-366.
- Ortakci, F., Sert, S. (2012) Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *J. Dairy Sci.* **95**, 6918–6925.
- Ough, C. S., Amerine, M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, John Wiley & Sons. Inc., New York, str. 196-221.
- Özer, B., Uzun, Y. S., Kirmaci, H. A. (2008) Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* **61**, 237–244.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Int. J. Pharmacogn. Phyt. Res.* **2**, 270-278.

- Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M. (2012) A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 27-32.
- Peppas, N. A. (1986) *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, FL, SAD, str. 180.
- Peppas, N., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J., Zhang J. (2000) Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 9-29.
- Pérez-Chabela, M. L., Lara-Labastida, R., Rodriguez-Huezo, E., Totosaus, A. (2013) Effect of spray drying encapsulation of thermotolerant lactic acid bacteria on meat batters properties. *Food Bioprocess. Technol.* **6**, 1505–1515.
- Petreska-Ivanovska, T., Petrushevska-Tozi, L., Grozdanov, A., Petkovska, R., Hadjieva, J., Popovski, E., Stafilov, T., Mladenovska, K. (2014) From optimization of synbiotic microparticles prepared by spray-drying to development of new functional carrot juice. *Chem. Ind. Chem. Eng.* **20**(4), 549-564.
- Racoviță, S., Vasiliu, S., Popa, M., Luca, C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Rev. Roum. Chim.* **54**(9), 709-718.
- Rafati, H., Coombes, A. G. A., Adler, J., Holland, J., Davis, S. S. (1997) Protein-loaded PLGA microparticles for oral administration: Formulation, structural and release characteristics. *J. Contr. Rel.* **43**, 89–102.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231–1237.
- Remminghorst, U., Rehm, B. H. A. (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1701–1712.
- Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S., Ferreira Grosso, C. R. (2012) Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food Bioprod. Process.* **90**, 37–42.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., Mooney, D. J. (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20**, 45–53.

- Sah, H. (1997) Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: Effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres. *J. Contr. Rel.* **47**, 233–245.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E. J. (2010) Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Res. Int.* **43**, 111–117.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **22**, 2073-2085.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J. (1998) Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* **38**(8), 689–753.
- Schütz, K., Carle, R. Schieber, A. (2006) *Taraxacum* – A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Sci. Dir.* **107**, 313-323.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D., Livney, Y. D. (2007) Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloid.* **21**, 936–942.
- Serafini, M., Ghiselli, A., Ferro-Luzzi, A. (1996) *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**, 28–32.
- Serafini, M., Maiani, G., Ferro-Luzzi, A. (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* **128**, 1003–1007.
- Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Yang, H, Ji, R. (2008) Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *Int. J. Pharm.* **349**, 83–93.
- Siepmann, J., Peppas, N. A. (2001) Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48**, 139–157.
- Sigstedt, S. C., Hooten, C. J., Callewaert, M. C., Jenkins, A. R., Romero, A. E., Pullin, M. J. (2008) Evaluation of aqueous extracts of *Taraxacum officinale* on growth and invasion of breast and prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **32**, 1085–1090.
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., Shivakumar, H.G. (2010) Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Res. Pharm. Sci.* **5**(2), 65-77.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-179.



- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
- Smidsrod, O., Skjak-Braek, G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* **8**,71–78.
- Smith, J., Charter, E. (2010) Microencapsulation in functional food product development. U: Functional Food Product Development, (Sanguansri, L., Augustin, M., ured.), Wiley-Blackwell, Chichester, UK, str. 3-19.
- Sohail, A., Turner, M. S., Prabawati, E. K., Coombes, A. G. A., Bhandari, B. (2012) Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 162–166.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., Tharanathan, R. N. (2007) Effects of plasticizers and fatty acid on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloid.* **21**, 1113-11
- Szente, L., Mikuni, K., Hashimoto, H, Szejtli, J. (1998) Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Mol.* **32**, 81–89.
- Takahashi, M., Inafuku, K., Miyagi, T., Oku, H., Wada, K., Imura, T., Kitamoto, D. (2007) Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *J. Oleo Sci.* **56**, 35–42.
- Tanouchi, M., Takahashi, K., Fukunaga, K, Murakawa, K. (2007) Functional material and functional food comprising useful phospholipid composition. WO 2007/046386A1.
- Tello, F., Falfan-Cortés, R. N., Martines-Bustos, F., Martins da Silva, V., Hubinger, Grosso, C. (2015) Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloid.* **43**, 670-678.
- Totosaus, A., Ariza-Ortega, T., Pérez-Chabela, M. (2013) Lactic acid bacteria microencapsulation in sodium alginate and other gelling hydrocolloids mixtures. *J. Food Nutr. Res.* **52**, 107-120.
- Uludag, H., de Vos, P., Tresco, P. A. (2000) Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug Delivery Rev.* **42**, 29–64.
- Urbanska, A. M., Bhathena, J., Prakash, S. (2007) Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yoghurt for therapeutic oral delivery: preparation and *in-vitro* analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Can. J. Physiol. Pharm.* **85**, 884–893.

- van het Hof, K. H., deBoer, H. S. M., Wiseman, S. A., Lien, N., Weststrate, J. A., Tijburg, L. B. M. (1997) Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 1125–1132.
- Vandamme, T. F., Poncelet, D., Subra-Paternault, P. (2007) *Microencapsulation: des sciences aux technologies*, 2. izd., Lavoisier Tec & Doc, Pariz, Francuska.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S. E. (2009) *Materials for Encapsulation. U: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (Zuidam, N. J., Nedović, V. A., ured.), Springer, Dordrecht, Nizozemska, str. 31-100.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S. E. (2010) *Materials for Encapsulation. U: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing* (Zuidam, N. J., Nedovic, V. A., ured.), Springer, Dordrecht, Nizozemska, str. 31-100.
- Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., Hale, A. (1995) Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin. Chem.* **41**, 32–35.
- Wildman, R. E. C., Kelley, M. (2001) *Nutraceuticals and Functional Foods. U: Handbook of nutraceuticals and functional foods* (Wildman, R.E.C., ured.), Taylor and Francis, Boca Raton, SAD, str. 1–22.
- Willfort (2002) *Ljekovito bilje i njegova upotreba*, 1. izd., Erudit, Zagreb.
- Williams, C. A., Goldstone, F., Greenham, J. (1995) Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* **42**, 121–127.
- Williams, C. A., Goldstone, F., Greenham, J. (1996) Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* **42**, 121–127.
- Wolbis, M., Krolikowska, M. (1985) Polyphenolic compounds of dandelion (*Taraxacum officinale*). *Acta Pol. Pharm.* **42**, 215–221.
- Wolbis, M., Królikowska, M., Bednarek, P. (1993) Polyphenolic compounds in *Taraxacum officinale*. *Acta Pol. Pharm.* **50**, 153–8.
- Wu, K.G., Chai, X. H., Chen, Y. (2005) Microencapsulation of fish oil by simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose. *Chinese J. Chem.* **23**, 1569–1572.

- Xiao, C., Zhu, L., Lou, W., Song, X., Deng, Y. (2010) Combined Action of Pure Oxygen Pretreatment and Chitosan Coating Incorporated with Rosemary Extracts on the Quality of Fresh-Cut Pears. *Food Chem.* **121**, 1003-1009.
- Yarlagadda, A. B., Wilkinson, M. G., Ryan, S. P., Doolan, I. A., O'Sullivan, M. G., Kilcawley, K. N. (2014) Utilisation of a cell-free extract of lactic acid bacteria entrapped in yeast to enhance flavour development in Cheddar cheese. *Int. J. Dairy Technol.* **67**, 21–30.
- Yeo, Y., Park, K. (2004) Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharm. Res.* **27**(1), 1–12.
- Yong-Lee, K., Hong-Yuk, S. (2007) Polymeric protein delivery systems. *Sci. Dir.* **32**, 669-697.
- Young, J. F., Nielsen, S. E., Haraldsdottir, J., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandstrom, B., Dragsted, L. O. (1999) Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 87–94.
- Zhang, J., Kang, M. J., Kim, M. J., Kim, M. E., Song, J. H., Lee, Y. M. (2008) Pancreatic lipase inhibitory activity of *Taraxacum officinale* *in vitro* and *in vivo*. *Nutr. Res. Pract.* **2**, 200–203.
- Zohar-Perez, C., Chet, I., Nussinovitch, A. (2004) Irregular textural features of dried-alginate-filler beads. *Food Hydrocolloid.* **18**, 249-258.