

# Inkapsulacija polifenola maslačka (*Taraxacum officinale* L.) u pektinske sustave nosača primjenom različitih tehnika

---

Vugrinec, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

*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:159:239303>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-21**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Kristina Vugrinec**

7105/PT

**INKAPSULACIJA POLIFENOLA MASLAČKA  
(*Taraxacum officinale* L.) U PEKTINSKE SUSTAVE  
NOSAČA PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

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

**Zagreb, 2018**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

### INKAPSULACIJA POLIFENOLA MASLAČKA (*Taraxacum officinale* L.) U PEKTINSKE SUSTAVE NOSAČA PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA

*Kristina Vugrinec, 0058207281*

**Sažetak:** U novije vrijeme, prehrambena industrija razvija nove funkcionalne prehrambene proizvode obogaćene različitim bioaktivnim komponentama biljnog podrijetla s pozitivnim utjecajem na zdravlje. No, zbog njihove izrazite nestabilnosti i niske bioraspodivnosti u organizmu poželjno ih je zaštititi, a u tu svrhu najčešće se koristi tehnika inkapsulacije aktivnih sastojaka u različite biopolimerne nosače. Cilj ovog rada je ispitati učinkovitost inkapsulacije polifenolnog ekstrakta maslačka (*Taraxacum officinale* L.) primjenom ionskog geliranja i sušenja raspršivanjem. Kao nosač za imobilizaciju polifenola korišten je pektin te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke te kakaovim prahom, rogačem i zelenom kavom, kao novim inkapsulacijskim materijalima. Formiranim hidrogel česticama i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem ispitana su fizikalno-kemijska svojstva, parametri boje, učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta te profil otpuštanja istih iz čestica u gastrointestinalnim uvjetima. Dobiveni rezultati pokazali su da je dodatak novih materijala u pektinski nosač rezultirao nastajanjem većih, tvrdih i elastičnijih hidrogel čestica, dok su sustavi dobiveni sušenjem raspršivanjem pokazali visok stupanj kohezivnosti. Znatno veću učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola pokazali su sustavi dobiveni ionskim geliranjem, od kojih je sustav s dodatkom izolata proteina sirutke imao najveći stupanj zadržavanja (90,08 %). Među sustavima dobivenim sušenjem raspršivanjem najveći stupanj inkapsulacije ukupnih polifenola imao je sustav pektin-zelena kava (55,16 %). Iako su sustavi dobiveni ionskim geliranjem imali poželjni kontinuirani profil otpuštanja ukupnih polifenola, kod čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem u istom se vremenskom periodu otpustio veći udjel istih, što ukazuje na visoki potencijal obje inkapsulacijske tehnike za imobilizaciju biljnih polifenola.

**Ključne riječi:** *ionsko geliranje, maslačak, pektin, polifenoli, sušenje raspršivanjem*

**Rad sadrži:** 65 stranica, 13 slika, 9 tablica, 94 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Datum obrane:** 9. srpnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

### **ENCAPSULATION OF DANDELION (*Taraxacum officinale* L.) POLYPHENOLS IN PECTIN-BASED CARRIERS USING DIFFERENT TECHNIQUES**

***Kristina Vugrinec, 0058207281***

**Abstract:** Recently, food industry has been developing new functional food products enriched with various bioactive components of plant origin with a positive health impact. However, because of their high instability and low bioavailability in the organism, it is desirable to protect them, and for this purpose, encapsulation of active ingredients in various biopolymer carriers is most often used. The aim of this study is to examine encapsulation efficiency of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenolic extract using ionic gelation and spray drying. Pectin and its combinations with whey protein isolates, and cocoa powder, carob and green coffee, as new materials, were used as delivery systems for immobilization of active compounds. Formulated hydrogel particles and particles obtained by spray drying were tested for physico-chemical properties, colour parameters, the encapsulation efficiency of polyphenols and the retention of antioxidant capacity, as well as the release profile of evaluated compounds from particles in gastrointestinal conditions. The results showed that the addition of new materials in the pectin carrier resulted in formation of larger, harder and more elastic hydrogel particles, while the systems obtained by spray drying showed a high degree of cohesiveness. Notably higher encapsulation efficiency of total polyphenols showed systems obtained by ionic gelation, of which the system combined with whey protein isolates exhibited the highest degree of retention (90.08 %). Among systems obtained by spray drying, the highest degree of encapsulation of total polyphenols was evaluated in a system pectin-green coffee (55.16%). Although the systems obtained by ionic gelation had a desirable continuous release profile of total polyphenols, the particles obtained by spray drying in the same period released a higher content of total polyphenols, what indicates on high potential for the immobilization of plant polyphenols for both encapsulation techniques.

**Keyword:** *dandelion, ionic gelation, pectin, polyphenols, spray drying*

**Thesis contains:** 65 pages, 13 figures, 9 tables, 94 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Draženka Komes, Full professor

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

**Defence date:** July 9<sup>th</sup> 2018.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1 Inkapsulacija.....	3
2.1.1. Metode inkapsulacije.....	4
2.1.1.1. Ionsko geliranje.....	5
2.1.1.2. Sušenje raspršivanjem.....	6
2.2. Pektin – materijal za inkapsulaciju aktivnih tvari.....	8
2.3. Maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> L.).....	10
2.3.1. Zdravstveni učinci bioaktivnih komponenti maslačka.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1 Materijal.....	13
3.1.1. Uzorci.....	13
3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta maslačka.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Aparatura i pribor.....	14
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	16
3.2.2. Određivanje udjela ukupnih hidrosicimetnih kiselina.....	17
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	18
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	19
3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka u pektinske sustave nosača.....	20
3.2.6. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika hidrogel čestica.....	21
3.2.6.1. Određivanje veličine formuliranih čestica.....	21
3.2.6.2. Određivanje udjela vode.....	21
3.2.6.3. Određivanje parametara teksture.....	22
3.2.6.4. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom.....	23
3.2.7. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem.....	23
3.2.7.1. Određivanje parametara raspodjele veličine čestica.....	23
3.2.7.2. Određivanje udjela vode.....	24
3.2.7.3. Topljivost.....	24
3.2.7.4. Močivost.....	25

3.2.7.5. Određivanje učinkovitosti otapanja .....	25
3.2.7.6. Nasipna gustoća .....	25
3.2.8. Određivanje boje čestica dobivenih ionskim geliranjem i sušenjem raspršivanjem .....	27
3.2.9. Određivanje udjela klorofila u česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem .....	28
3.2.10. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta .....	28
3.2.11. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima .....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	31
4.1. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika hidrogel čestica .....	32
4.1.1. Određivanje veličine čestica, udjela vode i parametara teksture .....	32
4.1.2. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode .....	33
4.2. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem .....	34
4.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica i udjel vode .....	34
4.2.2. Određivanje topljivosti, močivosti i učinkovitosti otapanja .....	35
4.2.3. Određivanje nasipne gustoće, kohezivnosti i tecivosti .....	36
4.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem .....	37
4.4. Određivanje udjela klorofila u česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem .....	38
4.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem .....	40
4.6. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem s inkapsuliranim ekstraktom maslačka .....	44
5. ZAKLJUČCI .....	54
6. LITERATURA .....	56

## 1. UVOD

Polifenolni spojevi ekstrahirani iz biljnih izvora, kao što su ljekovito bilje, voće i povrće, posjeduju snažna antioksidacijska svojstva koja izravno utječu na prevenciju razvoja različitih kroničnih bolesti i karcinoma (Dai i Mumper, 2010). Stoga, u posljednje vrijeme, raste potražnja za prehrambenim proizvodima obogaćenim biološki aktivnim komponentama biljnog podrijetla, poput antioksidansa, karotenoida, eteričnih ulja i vitamina, koji imaju sposobnost modulirati metaboličke procese u organizmu i poboljšati zdravstveno stanje pojedinca. Međutim, zbog slabe stabilnosti bioaktivnih spojeva tijekom prerade i pripreme proizvoda, te njihove niske bioraspoloživosti u organizmu, šira primjena biološki aktivnih spojeva je ograničena (Mahfoudhi i sur., 2016). Kao moguće rješenje pruža se primjena inkapsulacijskih tehnika s ciljem sporijeg i kontinuiranog otpuštanja bioaktivnih spojeva u organizmu te njihove poboljšane kemijske apsorpcije u epitelnim stanicama crijeva (Li i sur., 2015). Najčešće korištene metode inkapsulacije su ionsko geliranje, sušenje raspršivanjem hlađenje raspršivanjem i emulzifikacija (Nedović i sur., 2011). Izbor najprikladnije metode ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima nosača i spoja koji se inkapsulira, veličini formuliranih čestica, mehanizmu otpuštanja inkapsuliranog spoja iz čestica i o cijeni uređaja. Kao nosači mogu se koristiti razni polimeri koji moraju biti biorazgradivi (Chen i sur., 2006) i sigurni za ljudsko zdravlje (GRAS status) (Nazzaro i sur., 2012). Najčešće korišteni materijali za imobilizaciju bioaktivnih komponenti su polisaharidi, od kojih se najviše koriste pektin, alginat, karagenan, škrob i njegovi derivati, te razne biljne izlučevine kao što je guma arabika. Osim prirodnih i modificiranih polisaharida, za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva također su prikladni proteini (izolati proteina sirutke i kazein) i lipidi (voskovi).

Cilj ovog rada je usporediti učinkovitost dviju inkapsulacijskih tehnika, ionskog geliranja i sušenja raspršivanjem, te ispitati potencijal novih materijala u sustavu pektinskih nosača u svrhu imobilizacije polifenolnog ekstrakta maslačka. Kao glavni nosač koristit će se pektin, a u svrhu smanjenja poroznosti pektinskog gela te poboljšanja inkapsulacijskih parametara, isti će se kombinirati s izolatima proteina sirutke, kao standardnim nosačem te kakaovim prahom, rogačem i zelenom kavom, kao novim materijalima u sustavu nosača koji do sad nisu korišteni u inkapsulacijske svrhe. Dobivenim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka odredit će se fizikalno-kemijske karakteristike (veličina čestica, udjel vode, parametri teksture, sposobnost bubrenja), kao i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem (raspodjela veličine čestica, udjel vode, topljivost, močivost, učinkovitost otapanja i parametri tecivosti). Također, ispitat će se parametri boje, a česticama dobivenim

sušenjem raspršivanjem odredit će se i udjel klorofila. Nadalje, svim sustavima ispitat će se učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, kao i učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta te profil otpuštanja istih u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Inkapsulacija

Tehnika inkapsulacije primarno je konstruirana radi razvoja farmaceutskog industrijskog sektora, čiji je cilj bio omogućiti kontrolirano otpuštanje lijekova u organizmu. Od tada, inkapsulacijska tehnika je napredovala, modificirala se i prilagodila različitim svrhama i materijalima. Iako je primjena inkapsulacijskih tehnika još uvijek znatno zastupljena u farmaceutskoj industriji (68 %), a u prehrambenoj industriji svega 13 % (Martins i sur., 2014), ipak, posljednjih godina zbog sve većeg interesa potrošača javlja se potreba za obogaćivanjem prehrambenih proizvoda različitim bioaktivnim sastojcima u inkapsuliranom obliku.

Inkapsulacija je tehnika koja obuhvaća pakiranje krutih, tekućih ili plinovitih čestica unutar zaštitne membrane. Aktivna tvar koja se inkapsulira može biti čista tvar ili smjesa različitih tvari, a naziva se jezgra, aktivno sredstvo, unutarnja faza, srž ili punjenje, a tvar koja se koristi za obavijanje aktivne tvari se naziva membrana, ljuska ili nosač. Dobivene čestice su veličine od nekoliko nm pa do nekoliko mm, ovisno o korištenoj inkapsulacijskoj tehnici (Wandrey i sur., 2009). Različite značajke čestica ovise o konačnom proizvodu koji ih sadrži. Pri izboru tehnike i sirovine za inkapsulaciju treba uzeti u obzir veličinu i oblik čestice te kemijska svojstva, razgradivost i propusnost njene stijenke. Mikročestice s nepropusnom stijenkom koriste se za inkapsulaciju aktivnih tvari čije se otpuštanje u okolinu odvija vrlo brzo i pri točno određenim uvjetima, dok mikročestice s propusnom stijenkom omogućuju produljeno oslobađanje aktivne komponente u okolinu (Jyothi i sur., 2012).

Spojevi koji se žele ugraditi u određeni prehrambeni sustav moraju biti stabilni. No, biološki aktivne tvari koje su zdravstveno korisne, kao što su polifenoli, vitamini, minerali i probiotici, osjetljive su na svjetlost, kisik, vodu i toplinu, stoga je njihova bioraspodivnost u prehrambenom proizvodu ograničena (Champagne i Fustier, 2007). Iz navedenog razloga potrebno je primijeniti odgovarajuću inkapsulacijsku tehniku kako bi se osigurala stabilnost bioaktivne tvari u prehrambenom proizvodu tijekom proizvodnje, skladištenja i konzumacije. Također, za postizanje visoke inkapsulacijske učinkovitosti, potrebno je osigurati ponovljivost procesa, prihvatljiv profil otpuštanja aktivne tvari iz čestica te spriječiti njihovu agregaciju i sljepljivanje (Kuang i sur., 2010).

Da bi se neka inkapsulacijska tehnika smatrala učinkovitom mora zadovoljiti sljedeće uvjete:

- 1) izabrana inkapsulacijska tehnika mora rezultirati visokom inkapsulacijskom učinkovitošću, a provedba inkapsulacije mora biti jednostavna i lako primjenjiva na industrijsku proizvodnju (Vladisavljević, 2012).
- 2) proizvedene mikročestice se moraju odlikovati visokom fizikalno-kemijskom stabilnošću (Donsi i sur., 2011)
- 3) inkapsulirani sastojak mora biti zaštićen od degradacije uzrokovane nepovoljnom temperaturom, vlagom, svjetlošću ili nepovoljnim pH, te rizik od mogućih interakcija s drugim sastojcima hrane mora biti minimalan (McClements i sur., 2007)
- 4) otpuštanje inkapsuliranih spojeva u okolinu mora biti ravnomjerno i kontrolirano (Acosta, 2009)
- 5) nepoželjni okusi, mirisi i boja moraju biti maskirani te ne smiju utjecati na izvedbu konačnog proizvoda (Sobel i sur., 2014)

Zbog sve veće primjene inkapsulacijskih tehnika u prehrambenoj industriji povećao se spektar tvari koje se mogu inkapsulirati. Iako se često inkapsuliraju specifični nosioci okusa, također je moguće inkapsulirati i antioksidanse, umjetne zaslađivače, poboljšivače okusa, prehrambene kiseline i boje, konzervanse, vitamine, plinove, enzime i mikroorganizme (Augustin i sur., 2001). Kao nosači za imobilizaciju aktivnih spojeva uglavnom se koriste prirodni materijali, od kojih najviše polisaharidi zbog svog velikog afiniteta prema različitim bioaktivnim spojevima (Serra Costa i sur., 2015). Škrob, celuloza te njihovi derivati (amiloza, amilopektin, dekstrin) imaju široku primjenu, kao i biljni ekstrakti i izlučevine (pektin, polisaharidi soje, guar guma, guma arabika). Ekstrakti dobiveni iz morskih trava, poput alginata i karagenana, također se koriste kao nosači za inkapsulaciju bioaktivnih komponenti u hrani. Isto tako, mogu se koristiti polisaharidi mikrobnog i životinjskog podrijetla, kao što su dekstran, kitozan, ksantan i gelan. Osim prirodnih i modificiranih polisaharida, u inkapsulacijske svrhe moguće je koristiti proteine (izolati proteina sirutke, želatina, kazein) i lipide (pčelinji vosak, karnauba vosak). Prilikom odabira odgovarajućeg prirodnog materijala, kao nosača za inkapsulaciju, potrebno je poznavati njegove fizikalno-kemijske karakteristike kako bi se proizvele čestice s visokim stupnjem inkapsulacije bioaktivnih spojeva.

### **2.1.1. Metode inkapsulacije**

U posljednjih nekoliko godina razvijene su različite tehnike inkapsulacije koje imaju široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te u biotehnologiji i

agronomiji (Jangra i Bhatt, 2017), a izbor inkapsulacijske tehnike ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima materijala koji se inkapsulira. Pri proizvodnji funkcionalnog prehrambenog proizvoda potrebno je uzeti u obzir svojstva materijala za inkapsulaciju, stabilnost i funkcionalnost aktivne komponente te parametre proizvodnog procesa (Nedović, 2011). Inkapsulacijske tehnike se razlikuju prema mehanizmu formiranja čestica i prema specifičnoj opremi koja se koristi (Dias, 2015).

Metode inkapsulacije bioaktivnih spojeva se prema izvedbi mogu podijeliti u četiri skupine:

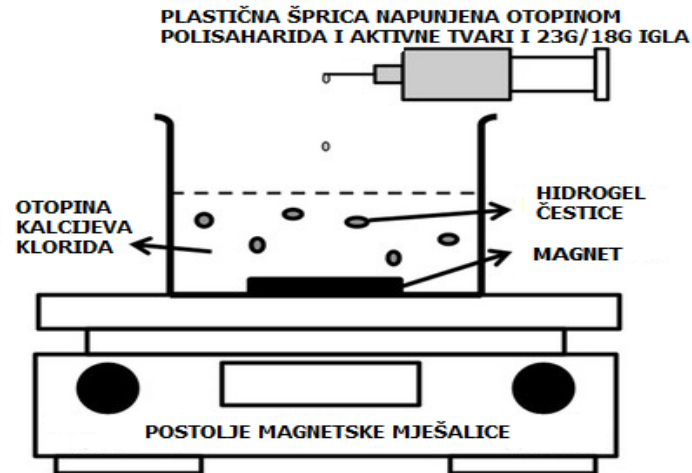
- Fizikalne metode – sušenje raspršivanjem i tehnika inkapsulacije primjenom superkritičnih fluida
- Kemijske metode – granično unakrsno povezivanje, granična polimerizacija, *in situ* polimerizacija
- Fizikalno-kemijske metode – metode temeljene na ionskim interakcijama, emulzifikacija i isparavanje otapala, metode temeljene na hidrofobnim interakcijama
- Ostale metode – kokristalizacija, molekularna inkluzija, inkapsulacija u stanicama kvasaca (Munin i Edwards-Lévy, 2011)

#### **2.1.1.1. Ionsko geliranje**

Ionsko geliranje je inkapsulacijska metoda koja se može provesti atomizacijom, ukapavanjem (koestruzijom) ili elektrostatičkim raspršivanjem (de Moura i sur., 2017). Ionsko geliranje ukapavanjem se najčešće provodi, tehnika je jednostavna i jeftina, a produkti inkapsulacije su hidrogel čestice. Faktori koji utječu na učinkovitost inkapsulacije te veličinu i oblik hidrogel čestica su koncentracija polimera i otopine iona, temperatura, pH otopine za geliranje i koncentracija otopine bioaktivnog sastojka (Racovića i sur., 2009). Glavna prednost ionskog geliranja je visok stupanj zaštite inkapsulirane tvari u sustav nosača i duže zadržavanje njene aktivnosti u formiranoj čestici. No, visoke temperature, snažno miješanje ili primjena štetnih organskih otapala mogu razgraditi tvar koju se inkapsulira (Colak i sur., 2016). Također, metoda je manje pogodna za inkapsulaciju hidrofilnih ili niskomolekulskih tvari zbog njihove brze difuzije kroz omotač hidrogel čestice (Kim i sur., 2016). Nadalje, metoda zahtjeva upotrebu igle, što se smatra nedostatkom jer rezultira česticama većeg promjera (Patil i sur., 2010).

Tehnika ionskog geliranja ne zahtijeva specifičnu opremu (slika 1) (Patel i sur., 2016). Provodi se ukapavanjem otopine polisaharida u vodenu otopinu polivalentnih kationa. Aktivna komponenta koja se inkapsulira se otopi u otopini polisaharida te zatim ukapava u

stalno miješajuću otopinu viševalentnih iona. Kationi iz otopine difundiraju u kap otopine polisaharida stvarajući trodimenzionalnu rešetku u novonastaloj hidrogel čestici (Patil i sur., 2010). Gel kuglice se zatim filtriraju, isperu destiliranom vodom i suše.



**Slika 1.** Prikaz pripreme hidrogel čestica tehnikom ionskog geliranja (Patel i sur., 2016)

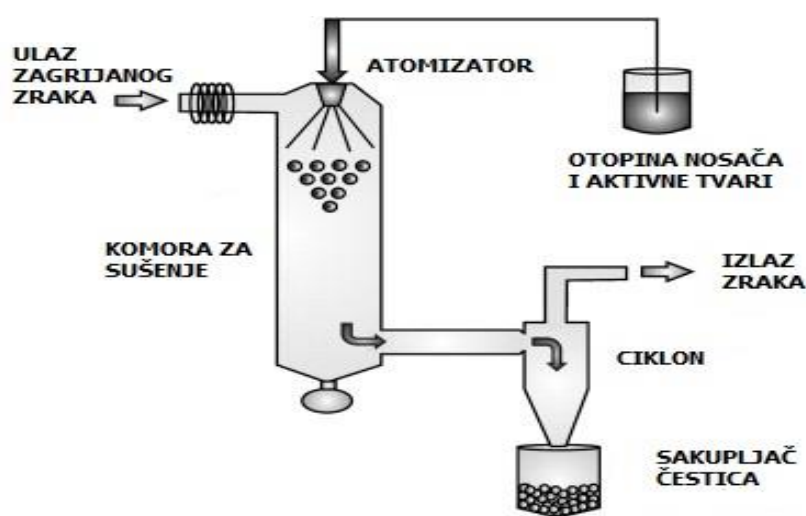
S obzirom da se vrlo često kao nosači koriste pektin, alginat, želatina ili guma, koji su hidrofilni, onda se uglavnom inkapsuliraju hidrofobne i slabo topljive biološki aktivne komponente. Razlog tome je što hidrofilna aktivna tvar se dobro miješa s hidrofilnom otopinom nosača, stoga je teže postići dobru faznu odvojenost između jezgre i omotača (Kurozawa i Dupas Hubinger, 2017). No, unatoč tome provedena su brojna istraživanja koja su uključivala inkapsulaciju hidrofilnih bioaktivnih komponenti metodom ionskog geliranja u alginatni ili pektinski nosač s visokim stupnjem inkapsulacije.

### 2.1.1.2. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je jedna od najstarijih tehnoloških operacija kojom se tekućine, mulj i slabo viskozne paste prevode u suhu i čvrstu praškastu tvar. Otopina se u komori raspršuje u sitne kapljice koje zatim dolaze u kontakt s vrućim zrakom (Rodriguez-Hernandez i sur., 2005). Osim što se u prehrambenoj industriji koristi kao metoda sušenja namirnica, koristi se i kao metoda inkapsulacije, koja podrazumijeva hvatanje tvari unutar zaštitnog omotača s ciljem zaštite bioaktivnih spojeva od oksidacije, temperature i svjetlosti (Elez Garofulić, 2016). Metoda je također pogodna i za maskiranje neugodnog okusa kao što su trpkost i gorčina polifenola (Nedović i sur., 2011). Tehnika omogućuje inkapsuliranje

temperaturno osjetljivih komponenti, jer se atomizacija otopine nosača i aktivne tvari u struji vrućeg zraka događa vrlo brzo (traje nekoliko milisekunda) pa je stoga temperatura mikročestica relativno niska (Đorđević i sur., 2015). Tehnika se uglavnom koristila za inkapsulaciju hidrofilnih sastojaka, ali napretkom tehnologije uspješno je inkapsuliran velik broj različitih lipofilnih tvari (Harris i sur., 2011). Sušenje raspršivanjem je jedna od najčešće korištenih metoda inkapsulacije zbog niskih operativnih troškova, proizvodnje mikročestica koje su mikrobiološki stabilne i brzo topive te zbog smanjenja troškova transporta i skladištenja (Gharsallaoui, 2007). Ovisno o materijalu koji se inkapsulira i radnim uvjetima tijekom sušenja, produkt sušenja raspršivanja može biti fini prah kojeg čine čestice manje od 40  $\mu\text{m}$  (Zuidam i Heinrich, 2009), ali i prah koji sadrži čestice veličine 2-3 mm (Gharsallaoui, 2007). Čestice dobivene sušenjem raspršivanjem nije potrebno dalje procesirati, to jest nema potrebe za postupkom mljevenja (Matioli i Rodriguez-Amaya, 2002). Sušenje raspršivanjem je jednostavan i fleksibilan proces, što ga čini pogodnim za upotrebu u proizvodnji širokog spektra prehrambenih i farmaceutskih proizvoda. Oko 85 % mikročestica je dobiveno sušenjem raspršivanjem, dok je ostatak dobiven ostalim inkapsulacijskim tehnikama kao što su hlađenje raspršivanjem i smrzavanje raspršivanjem (Porzio, 2007; Milanovic i sur., 2010).

Svaki uređaj za sušenje raspršivanjem sadrži nekoliko ključnih dijelova opreme (slika 2), a to su: 1) sustav za sušenje uzorka raspršivanjem; 2) sustav za zagrijavanje i kontroliranje temperature zraka u komori; 3) sustav za kontroliranje brzine ulaznog toka vrućeg uzorka; 4) sustav za unos zraka; 5) komora za sušenje; 6) sustav za odvajanje čestica praha od zraka (Silveira i sur., 2013).



**Slika 2.** Shematski prikaz inkapsulacije sušenjem raspršivanjem (Sosnik i Seremeta, 2015)

Sušenje raspršivanjem kao metoda inkapsulacije uključuje četiri faze:

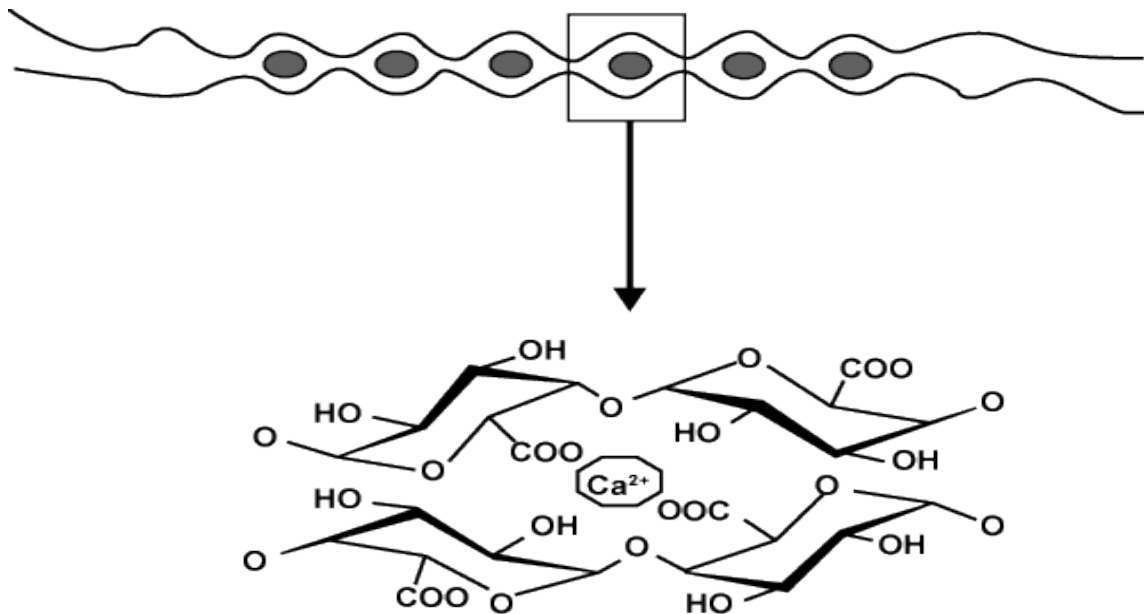
- 1) Priprema otopine - uključuje formiranje otopine aktivne tvari koja se inkapsulira i raspršuje u otopini nosača.
- 2) Atomizacija - otopina za inkapsulaciju se raspršuje u kapljice velike specifične površine što omogućuje kraće vrijeme sušenja i formiranje sitnih čestica praha (Cal i Sollohub, 2010). Atomizacija se provodi pod visokim tlakom ili djelovanjem centrifugalne sile (Gharsallaoui, 2007).
- 3) Sušenje – čestice se odvede u komoru za sušenje gdje se miješaju u struji vrućeg zraka i dispergiraju. Proces sušenja započinje kontaktom kapljica suspenzije i vrućeg zraka, pri čemu oko 95% vode ispari iz kapljica u svega nekoliko sekundi (Patel i sur., 2009). Sušenje je završeno kada temperatura u čestici postigne vrijednost temperature okolnog zraka.
- 4) Odvajanje i sakupljanje čestica - veće čestice se skupljaju na dnu komore za sušenje, a za izdvajanje manjih čestica koriste se cikloni. Ovisno o količine preostale vode i plina u česticama, one mogu biti šuplje ili kompaktne.

## **2.2. Pektin – materijal za inkapsulaciju aktivnih tvari**

Pektin je prirodni biopolimer koji se u najvećoj koncentraciji nalazi u središnjoj lameli stanične stijenke biljne stanice. Broj biljnih izvora koji se mogu koristiti za proizvodnju pektina je ograničen jer sposobnost pektina da formira gel strukturu ne ovisi samo o molekularnoj masi, stupnju esterifikacije (DE) i količini neutralnih šećera u bočnom lancu nego ovisi i o pH vrijednosti okoline, vrsti šećera te prisutnosti iona (Löfgren i sur., 2006). Danas, komercijalni pektin se uglavnom dobiva ekstrakcijom iz kore citrusnog voća ili mesnatog dijela jabuke.

Pektin je makromolekula koja sadrži linearni lanac sastavljen od jedinica galakturonske kiseline povezanih  $\alpha$ -1,4 glikozidnom vezom. D-galakturonska kiselina čini oko 70% pektina, pri čemu su neke karboksilne grupe galakturonske kiseline metilirane, dok ostale nakon tretiranja s amonijakom prelaze u amidne grupe. Također, u strukturi pektina prisutni su i šećeri. Ramnoza je manja komponenta glavne okosnice pektina, a uloga joj je da omogući promjenu smjera pektinskog lanca. Osim ramnoze prisutni su i drugi šećeri kao što su L-arabinoza i D-galaktoza (Oakenful, 1991). Svojstva pektina ovise o stupnju esterifikacije. Kod niskoesterificiranog pektina manje od 40 % karboksilnih grupa je esterificirano, dok kod visokoesterificiranog pektina udio esterificiranih grupa iznosi 60 - 75

%. Stupanj esterifikacije utječe na svojstva pektina, pogotovo na svojstvo geliranja. Visokoesterificirani pektin ne sadrži dovoljno kiselinskih grupa za formiranje gela i precipitaciju s ionima metala, dok niskoesterificirani pektin zahtjeva prisutnost dvovalentnih kationa, najčešće kalcija, za stvaranje gel strukture. Mehanizam vezanja iona metala na pektin poznat je kao „egg box“ model (Hocq i sur., 2017), a podrazumijeva intermolekulsko povezivanje jedinica D-galakturonske kiseline i dvovalentnih kationa pri čemu dolazi do stvaranja karakteristične strukture nalik „kutiji za jaja“ („egg box“ model) (slika 3). Jačina gela povećava se uz povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  iona, ali se smanjuje povećanjem temperature i smanjenjem pH ( $\text{pH} < 3$ ) (Lootens i sur., 2003). U prisutnosti natrijevih i kalijevih iona pektin ne stvara gel strukturu (Racovića i sur., 2009).



**Slika 3.** Prikaz modela „kutija za jaja“, ionska interakcija između karboksilnih grupa poligalakturonske kiseline u molekuli pektina i dvovalentnog kationa  $\text{Ca}^{2+}$  (Allwyn Sundar Raj i su., 2012).

S obzirom da u posljednje vrijeme raste interes znanstvenika i prehrambene industrije za proizvodnjom funkcionalnih prehrambenih proizvoda primjenom inkapsulacijskih tehnika, inkapsulacija bioaktivnih spojeva se sve više provodi u pektinske sustave nosača, budući da pektinski gel omogućava sporo i kontrolirano otpuštanje inkapsulirane tvari u okolinu. U tablici 1 prikazani su primjeri inkapsuliranih bioaktivnih tvari u pektinske sustave nosača primjenom različitih tehnika inkapsulacije.

**Tablica 1.** Primjeri inkapsuliranih bioaktivnih tvari u pektinske sustave nosača

<b>Inkapsulirana aktivna tvar</b>	<b>Nosač</b>	<b>Metoda inkapsulacije</b>	<b>Referenca</b>
<b>Polifenoli maslačka</b>	Pektin, alginat	Ionsko geliranje u emulzijama	Belščak-Cvitanović i sur., 2016
<b>Ekstrakt sjemenki manga</b>	Pektin	Ionsko geliranje	Nithitanakool i sur., 2013
<b>Repaglinid, (antidijabetik)</b>	Pektin, alginat	Ionsko geliranje	Awasthi i sur., 2017
<b>Resveratrol</b>	Pektin	Ionsko geliranje	Das i sur., 2010
<b>Antocijani aronije, brusnice i borovnice</b>	Pektin, hidroksipropil metilceluloza	Ionsko geliranje	Oehme i sur., 2011
<b>Aktivne komponente zelenog čaja</b>	Pektin, alginat, karagenan, izolati proteina sirutke, inulin	Sušenje raspršivanjem	Belščak-Cvitanović i sur., 2015
<b>Probiotička kultura <i>Lactobacillus rhamnosus</i></b>	Pektin, proteini sirutke	Ionsko geliranje	Gerez i sur., 2012

### 2.3. Maslačak (*Taraxacum officinale* L.)

Maslačak *Taraxacum officinale* (L.) je trajna zeljasta biljka koja pripada porodici glavočika Asteraceae (*Compositae*), potporodici Cichorioideae, a rodu *Taraxacum* (Popescu i sur., 2010). Prema Hegi (1987), rod *Taraxacum* uključuje 30-57 vrsta s mnogo podvrsta svrstanih u devet odjeljaka.

Maslačak je korovska biljka čiji je korijen slabo razgranat, valjkast i mesnat, a stabljika je šuplja, cjevasta i bogata mliječnim sokom. Na vrhu stabljike se nalazi žuta cvjetna glavica sastavljena od jezičastih cvjetova koje oprašuju insekti. Listovi maslačka su



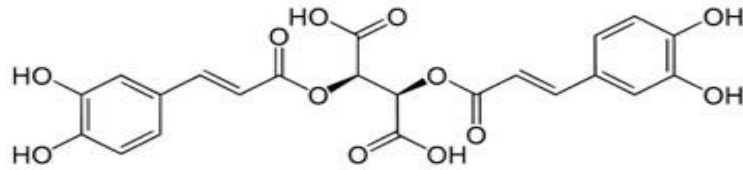
dugi, na rubovima pilasti, grubih i glatkih površina ovisno o staništu (Lesinger, 1999). Javlja se u rano proljeće i cvjeta kroz cijelu godinu. Nakon cvatnje formira se zračna lopta koju čine sjemenke koje se pomoću vjetra vrlo lako rasprostranjuju po čitavoj okolini. Cijela biljka je jestiva i ljekovita pa se zbog toga često sakuplja s prirodnih staništa.



**Slika 4.** Maslačak (Anonymous 1, 2017)

### **2.3.1. Zdravstveni učinci bioaktivnih komponenti maslačka**

Maslačak je ljekovita biljka koja sadrži kemijske spojeve koji mogu djelovati pojedinačno ili sinergijski. Zbog svojih ljekovitih svojstava koristi se u medicinske svrhe duže od 2000 godina s obzirom da konzumacija maslačka ne izaziva nikakve nuspojave. Gorke tvari prisutne u biljci djeluju na stimulaciju probave, dok se za polifenolne spojeve smatra da imaju protuupalnu i antioksidacijsku aktivnost (Ivanov, 2014). U turskoj narodnoj medicini koristi se kao laksativ, diuretik te kao lijek s potencijalnim antidijabetičkim svojstvima (Onal i sur., 2005), dok u kineskoj narodnoj medicini se koristi kako bi potaknuo imunološki odgovor na infekciju gornjih dišnih puteva, na bronhitis i pneumoniju. U kombinaciji s drugim ljekovitim biljem koristi se u prevenciji hepatitisa jer sadrži lipotropne tvari koje potiču rad hepatocita (Dorsch, 1996). Listovi maslačka sprečavaju anemiju jer su bogati željezom te tijekom trudnoće njihova konzumacija pokazuje pozitivan utjecaj na razvitak fetusa. Također, maslačak je važan izvor vitamina (A, C, D i E), inozitola, kolina, lecitina i oligoelemenata (González-Castejón i sur., 2012), a taraksinska kiselina, koja je karakteristična samo za maslačak i ne nalazi se ni u jednoj drugoj biljci, ima potencijalno antikancerogeno djelovanje (Choi i sur., 2002). Od hidroksicimetnih kiselina, u cvijetu, korijenu i listovima biljke prisutne su još kafeinska, klorogenska i čikorinska kiselina, od kojih je čikorinska kiselina zastupljena u najvećem udjelu (González-Castejón i sur., 2012).



**Slika 5.** Kemijska struktura čikorinske kiseline, najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u maslačku (Chen i sur., 2012)

Također, ekstrakt maslačka povećava izlučivanje tekućina kod zdravih ljudi (Clare i sur., 2009) te posjeduje aktivnost anti-HIV-1 retrovirusa (Han i sur., 2011). Prema istraživanju Zhang i suradnika (2012) konzumacija maslačka može pridonijeti sprečavanju pretilosti i metaboličkih poremećaja slabljenjem upalnih i oksidativnih procesa s obzirom da je dokazano inhibicijsko djelovanje maslačka na enzim lipazu.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1 Materijal**

##### **3.1.1. Uzorci**

Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog rada korišten je suhi list maslačka (*Taraxacum officinale* L.) podrijetlom iz Republike Hrvatske (berba 2017). Materijal je za potrebe ekstrakcije usitnjen u električnom mlinu i prosijan do određene veličine čestica. Kao nosač za inkapsulaciju polifenolnih spojeva maslačka korišten je komercijalni pektin. Ostali materijali koji su korišteni u sustavu pektinskih nosača su izolati proteina sirutke, kakaov prah, rogač i zelena kava. Rogač i zelenu kavu je prije provedbe analiza potrebno dodatno usitniti u električnom mlinu.

##### **3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta maslačka**

Ekstrakt maslačka priprema se prelijevanjem 20 g suhog i usitnjenog lista maslačka s 200 mL destilirane vode temperature 80 °C. Ekstrakcija se provodi 30 minuta, uz konstantno miješanje staklenim štapićem i održavanje temperature od 80 °C. Nakon ekstrakcije, uzorak se procijedi kroz metalno cijedilo koje je prekriveno slojem gaze. Postupak procjeđivanja uzorka kroz slojeve gaze se ponavlja sve dok se ne dobije bistri ekstrakt koji ne sadrži čestice uzorka. Ekstrakt se dopuni do poznatog volumena (200 mL) i ohladi na sobnu temperaturu.

##### **3.1.2. Kemikalije**

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

##### Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

##### Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

- Klorovodična kiselina 37 % (HCl), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- Natrijev nitrat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrij molibdat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (NaOH), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kafeinska kiselina, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

#### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom

- Etanol 96 %, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

#### Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica

- Niskoesterificirani pektin Classic CU 902 (DE=3,2%), Herbstreit & Fox KG (Neuenbürg, Njemačka)
- Izolati proteina sirutke, Davisco Foods International (La Suer, MN, SAD)
- Kakaov prah (10-12 % masti), Kraš d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Rogač, Šafram d.o.o (Zagreb, Hrvatska)
- Zelena kava (Etiopija)
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev citrat, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina 37 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrij hidrogen o-fosfat bezvodni, Fisher Chemical (Loughborough, Velika Britanija)
- Natrij dihidrogenfosfat-dihidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

### **3.1.3. Aparatura i pribor**

#### Priprema ekstrakta

- Električni mlin, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)
- Plamenik s azbestnom mrežicom

- Čaše volumena 250 mL i 500 mL i menzura volumena 250 mL
- Metalno cijedilo, gaza, termometar, štoperica

#### Spektrofotometrijske analize

- Spektrofotometar Helios  $\gamma$ , ThermoSpectronic (Cambridge, Velika Britanija)
- Kiveta (10 mm) za spektrofotometrijsko mjerenje
- Staklene epruvete, stakleni štapići
- Staklene čaše volumena 250 mL
- Staklene menzure volumena 50 mL i 100 mL
- Automatske mikropipete volumena 100-1000  $\mu$ L (Gilson, SAD)
- Staklene pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10-100 mL

#### Inkapsulacija i karakterizacija čestica

- Plastične šprice volumena 2 i 5 mL
- Igle 23G (0,6x30 mm) i 18G (1,20x40 mm)
- Čaše volumena 50 do 250 mL, metalno cijedilo, magneti
- Plastične epruvete volumena 2 ml i 15 mL
- Aluminijske posudice s poklopcima, eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Velika Britanija)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železnik, Slovenija)
- Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Uređaj za homogenizaciju reakcijske smjese (Vortex V-1 plus), bioSanMedical-Biological Research & Technologies (Riga, Latvija)
- Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak=0,2 mm) (Naarden, Nizozemska)
- TA.HDPlus analizator tekstone, Stable Micro Systems (Velika Britanija)
- Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Velika Britanija)
- Kolorimetar, CM-700d, CM- A177, Konica Minolta (Tokio, Japan)
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (Suzhou, Kina)
- Liofilizator, Martin Christ GmbH (Osterode am Harz, Germany)
- Uređaj za sušenje raspršivanjem, Büchi mini B-290 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

#### Princip metode

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

#### Postupak rada

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 µL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbanacije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

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

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel ukupnih

polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u dvije paralelene probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (EGK)/g čestica.

### **3.2.2. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina**

#### Princip metode

Određivanje udjela ukupnih 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 ukupnih hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

#### Postupak rada

Za određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina, 500 µL uzorka pomiješa se u staklenoj epruveti s 1 mL 0,5 M HCl, 1 mL Arnov-og reagensa (smjesa natrijevog nitrata i natrijevog molbidata), 1 mL 8,5%-tne vodene otopine 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 (KK)/g čestica.

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

#### Princip metode:

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

#### Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS<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 potrebno je pomiješati 88 µL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije ABTS<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 nakon točno 6 minuta izmjeri apsorbancija na 734 nm. Prije mjerenja uzorka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 µL vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$ , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

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

gdje su:



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

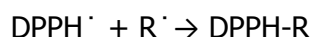
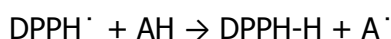
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

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

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

#### Princip metode:

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



#### Postupak rada:

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

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

Jednadžba baždarne krivulje:

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

gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

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

### **3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta maslačka u pektinske sustave nosača**

Bioaktivni spojevi maslačka inkapsulirani su dvjema inkapsulacijskim tehnikama, ionskim geliranjem i sušenjem raspršivanjem. Kao nosač za inkapsulaciju korišten je niskoesterificirani pektin. U metodi ionskog geliranja korištena je 10 %-tna (w/v) otopina pektina u ekstraktu maslačka radi formiranja sferičnih čestica, dok je u metodi sušenja raspršivanjem korištena 4 %-tna (w/v) otopina pektina kako bi se omogućilo adekvatno i kontinuirano raspršivanja otopine nosača kroz mlaznicu uređaja. Uz sustave pripremljene samo s pektinom, za svaku tehniku inkapsulacije, pripremljena su još četiri sustava, gdje se pektin (P) miješao s 20 %-tnim (w/v) otopinama izolata proteina sirutke (IPS), kakaovog praha (KP), rogača (R) te zelene kave (ZK) u omjeru 80:20. Takve pripremljene otopine korištene su kao nosači za inkapsulaciju polifenola maslačka.

U metodi ionskog geliranja postupak inkapsulacije proveden je ukapavanjem otopina nosača u 4 %-tnu (w/v) otopinu kalcijeva klorida prethodno pripremljenu u ekstraktu maslačka. Otopina nosača prenesena je u plastičnu špricu te istiskivana kroz iglu od 23 G (0,6x30mm) i 18 G (1,20x40mm) (u slučaju zelena kave) u otopinu gelirajućeg medija koja se kontinuirano miješala. Prilikom ukapavanja, uslijed interakcije galakturonskih jedinica pektina i kalcijevih iona došlo je do formiranja sferičnih čestica. Nakon što su se formirale sve čestice, iste su miješane u gelirajućem mediju dodatnih 30 minuta, a zatim filtriranjem izdvojene iz otopine kalcijevog klorida, isprane ekstraktom te spremljene u ekstrakt na +4 °C do analiza. Također, na prethodno opisan način pripremljene su kontrolne čestice koje su umjesto ekstrakta maslačka sadržavale destiliranu vodu.

Prethodno pripremljene otopine nosača su uz konstantno miješanje podvrgnute sušenju raspršivanjem u laboratorijskom uređaju Büchi mini B-290 (Büchi Labortechnik AG,

Švicarska) prema navedenim parametrima: promjer mlaznice za raspršivanje 0,7 mm; ulazna temperatura zraka za sušenje  $130 \pm 3$  °C; izlazna temperatura  $56 \pm 2$  °C; protok zraka 536 L/h; protok ulazne otopine 8 mL/min; atomizacijski tlak 6 psi; brzina pumpe 30 %. Dobiveni inkapsulirani ekstrakti maslačka sakupljeni su nakon hlađenja te spremljeni u odgovarajuće polietilenske vrećice i skladišteni pri temperaturi od 4 °C na suhom i tamnom mjestu.



**Slika 6.** Shematski prikaz formuliranih sustava nosača\* za inkapsulaciju polifenola maslačka primjenom dviju inkapsulacijskih tehnika

\* P – pektin; P-IPS – pektin-izolati proteina sirutke; P-KP – pektin-kakaov prah; P-R – pektin-rogač; P-ZK – pektin-zelena kava

### 3.2.6. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika hidrogel čestica

#### 3.2.6.1. Određivanje veličine formuliranih čestica

Hidrogel čestice snimljene su digitalnim fotoaparatom na Dino-Lite kalibracijskoj pločici (minimalni razmak=0,2 mm), iz koje je očitana veličina čestica. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost deset uzastopnih mjerenja (n=10) za svaki uzorak s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.6.2. Određivanje udjela vode

Princip metode

Ovim postupkom mjeri se masa suhe tvari nakon sušenja do konstantne mase, budući da na temperaturi sušenja od 105 °C dolazi do izdvajanja slobodne vlage iz uzorka. 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 0,3 g hidrogel 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.

#### Izračun rezultata

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

$$\text{Udjel vode (\%)} = (m_2 - m_3 / m_2 - m_1) \times 10 \quad (1)$$

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

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)

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

### **3.2.6.3. Određivanje parametara teksture**

Analiza teksture provedena je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), opremljenom s utegom od 5 kg. 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) na sobnoj temperaturi. 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 uzoraka, dok se maksimalna udaljenost sonde prilikom probijanja uzorka ispod krivulje (sile) koristi za računanje elastičnosti (mm). Elastičnost je izražena na 50% vrijednosti očitane za tvrdoću. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja (n=3) s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### **3.2.6.4. 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. Masa čestica je mjerena u određenim vremenskim intervalima (na početku, nakon 30 minuta, 1, 2, 4, 6 i 24 sata) na način da se čestice izdvoje iz tekućeg medija filtriranjem pomoću lijevka i filter papira, posuše staničevinom te se izvažu na analitičkoj vagi. Rezultati su prikazani kao omjer početne mase čestica i mase čestica nakon vezanja vode u određenom vremenskom periodu, a izraženi kao srednja vrijednost mjerenja (n=2) s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### **3.2.7. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem**

##### **3.2.7.1. Određivanje parametara raspodjele veličine čestica**

Raspodjela veličine čestica inkapsuliranih prahova ekstrakta maslačka, dobivenih sušenjem raspršivanjem, ispitana je primjenom laserske difrakcije, korištenjem laserskog analizatora veličine čestica Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, Velika Britanija), opremljenog jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000. Analiza veličine čestica temelji se na činjenici da čestice prilikom prolaska kroz izvor svjetlosti (lasersku zraku) raspršuju svjetlost pod određenim kutovima koji izravno ovise o veličini čestica. Laserska zraka ulazi u radnu ćeliju pod kutem od 0,02° do 140° te omogućuje određivanje veličine čestica u rasponu od 0,2 do 2000 µm. Zasićenje laserske zrake je podešeno na 2-6%, a za svaki uzorak provedena su tri paralelna mjerenja (n=3). Parametri raspodjele veličine čestica izraženi su kao d (0,1), d (0,5), d (0,9) te PSD rasponom, pri

čemu  $d(0,1)$  predstavlja promjer čestica od kojeg je 10 % čestica cijelog uzorka manje,  $d(0,5)$  promjer čestica za koji vrijedi da 50 % ukupnog broja čestica ima promjer manji od tog promjera,  $d(0,9)$  promjer čestica od kojeg je 90 % čestica cijelog uzorka manje. PSD raspon predstavlja homogenost raspodjele veličine čestica, a dobiven je korištenjem sljedeće formule (3):

$$PSD = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad (3)$$

### 3.2.7.2. Određivanje udjela vode

Udjel vode u inkapsuliranim česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem određen je isto kao i kod hidrogel čestica kako je opisano u poglavlju 3.2.6.2., samo što je masa čestica inkapsuliranih prahova maslačka iznosila 0,1 g.

### 3.2.7.3. Topljivost

Topljivost se odnosi na brzinu i opseg u kojem se sastojci čestica praha otapaju u vodi (Aguilera i sur., 1995). Topljivost je određena prema modificiranoj metodi Takashia i Seibia (1988). 0,625 g uzorka suspendirano je u 6,25 mL destilirane vode temperature 30 °C. Suspenzija je povremeno miješana 30 minuta, a nakon toga centrifugirana 15 minuta na 8500 rpm-a. Cijeli volumen dobivenog supernatanta kvantitativno je prenesen u prethodno izarene aluminijske posudice te sušen na 105 °C do konstantne mase. Mjerenje je provedeno u paralelama ( $n=2$ ), a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

Za određivanje topljivosti u vodi (%) koristi se masa osušenog uzorka prema formuli (4):

$$\% \text{ topljivosti} = \frac{m_3 - m_1}{m_2} * 100 \quad (4)$$

gdje je:

$m_1$  – masa praznog lončića (g)

$m_2$  – masa uzorka (g)

$m_3$  – masa lončića s uzorkom nakon sušenja (g)

#### 3.2.7.4. Močivost

Močivost ili vrijeme močenja izraženo je kao vrijeme potrebno da čestice praha probiju površinu medija sobne temperature te se istalože na dno posude (Schubert, 1980). U čašu volumena 250 mL dodano je 50 mL destilirane vode sobne temperature. Uzorci mase 0,05 g su usipani preko filter papira te je mjereno vrijeme (h) da se sav prah istaloži na dno posude. Mjerenja su provedena u duplikatu (n=2).

#### 3.2.7.5. Određivanje učinkovitosti otapanja

Učinkovitost otapanja (s) određena je prema metodi koju su opisali Sun-Waterhouse i sur. (2013), uz manje modifikacije. Količina od 0,25 g uzorka otopljen je u 5 mL destilirane vode pri sobnoj temperaturi. Smjesa je miješana na magnetnoj miješalici dok uzorak nije u potpunosti otopljen. Učinkovitost otapanja određena je kao vrijeme potrebno da smjesa postane homogena, odnosno da se sav uzorak otopi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri mjerenja (n=3) s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.7.6. Nasipna gustoća

Nasipna gustoća je određena prema modificiranoj metodi Murakamija i suradnika (2001). Uzorak je usipan u plastični cilindar te je zabilježena masa praznog cilindra, masa cilindra napunjenog uzorkom i očitana je volumen koji je zauzeo uzorak. Nasipna gustoća („bulk density“) u  $\text{g/cm}^3$  određena je kao omjer mase uzorka u cilindru i volumena uzorka u cilindru, prema formuli (5):

$$\text{Nasipna gustoća (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{masa uzorak (g)}}{V \text{ uzorak (cm}^3\text{)}} \quad (5)$$

Nakon određivanja nasipne gustoće, očitana je volumen u cilindru koji je uzorak zauzeo nakon 10 udaraca („loose density volumen“) i nakon 100 udaraca („tapped density“ volumen). Vrijednosti za „loose“ i „tapped“ gustoću ( $\text{g/cm}^3$ ) izražene su kao omjer mase uzorka usipanog u cilindar i očitanaog volumena nakon 10 udaraca („loose“), odnosno 100 udaraca („tapped“). Mjerenje je provedeno u triplikatu (n=3) te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

Preko vrijednosti nasipnih gustoća određuju se Carr indeks koji predstavlja svojstvo tečenja (Carr, 1965) i Hausnerov omjer (HR) kao svojstvo kohezivnosti (Hausner, 1967). To su bezdimenzijske veličine pomoću kojih se određuje kompresibilnost praškastih proizvoda. Carr indeks i Hausnerov omjer izračunavaju se preko dobivenih vrijednosti za nasipnu gustoću ( $\rho_{\text{bulk}}$ ) i gustoću nakon protresivanja 100 puta ( $\rho_{\text{tapped}}$ ).

Formula za izračunavanje Carr indeksa (6) je:

$$\text{Carr indeks} = \frac{(\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}})}{\rho_{\text{tapped}}} * 100 \quad (6)$$

Ovisno o vrijednosti Carr indeksa, uzorci se svrstavaju u kategorije navedene u tablici 2.

**Tablica 2.** Karakterizacija tecivosti prahova prema Carr indeksu

CARR INDEKS	TECIVOST
<15	vrlo dobra
15-20	dobra
20-35	dovoljna
35-45	loša
>45	vrlo loša

Formula za izračunavanje Hausnerov-og omjera (7) je:

$$\text{HR} = \frac{\rho_{\text{tapped}}}{\rho_{\text{bulk}}} \quad (7)$$

Ovisno o vrijednosti HR omjera, uzorci se svrstavaju u kategorije navedene u tablici 3.

**Tablica 3.** Karakterizacija kohezivnosti prahova prema Hausnerovom omjeru (HR)

HR	KOHEZIVNOST
<1,2	niska
1,2 - 1,4	srednja
>1,4	visoka



### 3.2.8. Određivanje boje čestica dobivenih ionskim geliranjem i sušenjem raspršivanjem

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 i sušenjem raspršivanjem 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 (8):

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2} \quad (8)$$

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 pektinski sustav

$a^*_{ref}$  - parametar boje referentnog uzorka – čisti pektinski sustav (crveno)

$b^*_{ref}$  - parametar boje referentnog uzorka – čisti pektinski sustav (žuto)

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

### 3.2.9. Određivanje udjela klorofila u česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem

#### Princip metode

Metoda (Huang i sur., 2007) se temelji na ekstrakciji klorofilnih pigmenata s 80 % acetonom. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski mjerenjem valne duljine na 663 i 645 nm, a kvantifikacija pojedinog pigmenta izračunava se prema poznatim jednadžbama.

#### Postupak rada

0,05 g uzorka ekstrahira se s 25 mL 80 % acetona - snažno se miješa 2 minute i zatim profiltrira kroz filter papir. Falcon-ica se do oznake od 25 mL nadopuni 80% acetonom. Izmjeri se apsorbancija filtrata na valnim duljinama od  $\lambda=663$  nm (za klorofil *a*) i  $\lambda= 645$  nm (klorofil *b*).

Udjeli klorofila *a* i *b* izračunavaju se prema jednadžbama (9) i (10):

$$\text{Klorofil } a \text{ (mg/L)} = 12,7 \times A_{663} - 2,95 \times A_{663} \quad (9)$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (mg/L)} = 22,95 \times A_{645} - 4,67 \times A_{645} \quad (10)$$

Udjel ukupnog klorofila izračunava se kao zbroj udjela prethodno određenih klorofila *a* i *b* prema formuli (11):

$$\text{Ukupni klorofil} = \text{klorofil } a + \text{klorofil } b \quad (11)$$

Određivanje udjela klorofila u uzorcima provedeno je u dvije paralelne probe ( $n=2$ ), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućim standarnim devijacijama, u  $\mu\text{g}$  klorofila/g uzorka.

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

Udjel ukupnih polifenola i ukupnih hidrosicimetnih kiselina ekstrakta maslačka imobiliziranih u pektinskim česticama, kao i antioksidacijski kapacitet, određen je otapanjem poznate količine profiltriranih hidrogel čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), dok

u slučaju čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem poznata masa čestica je otopljena u poznatom volumenu destilirane vode. Isti postupak je primijenjen i za čestice pripremljene s vodom, umjesto s ekstraktom. Vrijednosti dobivene za te sustave su oduzete od vrijednosti koje su dobivene za sustave nosača pripremljenih u ekstraktu maslačka, kako bi se mogao isključiti utjecaj polifenolnih spojeva koji su prirodno prisutni u nosačima.

Postotak (%) inkapsulacije ukupnih polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta izračunat je kao omjer udjela ukupnih polifenola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, kao i antioksidacijskog kapaciteta, u otopinama razbijenih čestica i udjela istih spojeva u početnim otopinama sustava nosača pripremljenih u ekstraktu maslačka.

Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteu reagensa (opisano u poglavlju 3.2.1.), udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina određen je u reakciji s Arnou-im reagensom (opisano u poglavlju 3.2.2.), dok je određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode opisano u poglavlju 3.2.3., a primjenom DPPH metode u poglavlju 3.2.4.

### **3.2.11. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima**

Otpuštanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola (3.2.1.) i udjela hidroksicimetnih kiselina (3.2.2.) te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS (3.2.3) i DPPH (3.2.4.) metoda. SGF se sastojao od natrijevog klorida i klorovodične kiseline (pH=1,2), dok je SIF odgovarao fosfatnom puferu (pH=7,4).

Čestice dobivene tehnikom ionskog geliranja izdvojene su iz otopine za geliranje te je 0,6 g profiltriranih čestica suspendirano u 30 mL SGF-a. Čestice u SGF-u konstantno 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, sve do potpunog otapanja hidrogel čestica.

Za praćenje otpuštanja ukupnih polifenola iz čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem, izvagano je 0,3 g uzorka te suspendirano u 30 ml SGF-a. Čestice u SGF-u konstantno 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 i centrifugirano. Dobiveni talog se kvantitativno prenesao u otopinu SGF-a, a supernatant sačuvao. Postupak se ponovio za svako slijedeće uzorkovanje te je nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama dodan alikvot od 2 mL SGF-a. Nakon što se izuzeo posljednji uzorak suspenzija se prenesla u falcon-icu i centrifugirala 5 minuta na 8000 rpm-a. Dobiveni supernatant se odbacio, a talog kvantitativno prenesao u čašu i prelio sa 30 mL SIF-a. Postupak uzorkovanja alikvota tekućeg medija je ponovljen u određenim vremenskim razmacima na prethodno opisani način, sve do potpunog otapanja čestica.

U ovako dobivenim alikvotima od 2 mL određen je udjel ukupnih polifenola (3.2.1.) (rezultat je izažen kao mg ekvivalenata galne kiseline/g čestica), udjel ukupnih hidrokscimetnih kiselina (3.2.2.) (rezultat je izražen kao mg kafeinske kiseline/g čestica) te antioksidacijski kapacitet ABTS (3.2.3.) i DPPH (3.2.4.) metodom (rezultati za obje metode su izaženi kao 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.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost pektinskog sustava nosača te kombinacije pektina s novo korištenim inkapsulacijskim materijalima, poput kakaovog praha, rogača i zelene kave, na sposobnost inkapsulacije polifenolnih spojeva ekstrakta maslačka (*Taraxacum officinale* L.) primjenom dviju inkapsulacijskih tehnika (ionsko geliranje i sušenje raspršivanjem).

Formuliranim hidrogel česticama određena je veličina čestica, udjel vode i parametri teksture koji su prikazani u tablici 4, dok je omjer povećanja mase liofiliziranih čestica prikazan u tablici 5. Česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem određene su fizikalno-kemijske karakteristike poput raspodjele veličine čestica i udjela vode (tablica 6), topljivosti, močivosti i učinkovitosti otapanja (tablica 7) i nasipne gustoće (tablica 8). Parametri boja ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E^*$ ) dobivenih čestica prikazani su u tablici 9, a udjel klorofila određen u česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem nalazi se na slici 7. Utjecaj dodatnih materijala (IPS, KP, R, ZK) u pektinski sustav nosača te izbor inkapsulacije tehnike na učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina prikazani su na slici 8, dok je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta prikazana na slici 9. Također, u radu je grafički prikazan i profil otpuštanja ukupnih polifenola iz hidrogel čestica i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (slika 10) u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, kao i otpuštanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina iz istih sustava pri istim uvjetima (slika 11). Prikazani su i profili otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih čestica ABTS metodom (slika 12) i DPPH metodom (slika 13).

#### 4.1. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika hidrogel čestica

##### 4.1.1. Određivanje veličine čestica, udjela vode i parametara teksture

**Tablica 4.** Veličina čestica, udjel vode i parametri teksture hidrogel čestica

UZORAK	Veličina	Udjel vode	Tvrdoća	Elastičnost
	(mm)	(%)	(N)	(mm)
<b>P</b>	2,70 ± 0,20	86,73 ± 0,34	0,11 ± 0,00	0,18 ± 0,01
<b>P-IPS</b>	2,90 ± 0,20	86,04 ± 0,07	0,12 ± 0,00	0,30 ± 0,02
<b>P-KP</b>	2,80 ± 0,30	85,28 ± 0,35	0,20 ± 0,02	0,36 ± 0,01
<b>P-R</b>	3,30 ± 0,30	86,37 ± 0,67	0,14 ± 0,00	0,31 ± 0,01
<b>P-ZK</b>	3,60 ± 0,30	84,99 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,27 ± 0,01

U Tablici 4 prikazana su fizikalno-kemijska svojstva različitih sustava čestica s inkapsuliranim polifenolima maslačka dobivenih ionskim geliranjem.

S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da su pektinski sustavi s dodatkom IPS, KP, R i ZK rezultirali formiranjem većih čestica, jer su čiste pektinske hidrogel čestice imale najmanju prosječnu veličinu ( $2,70 \pm 0,20$  mm). Od binarnih sustava najmanje čestice su one pripremljene s kakaovim prahom ( $2,80 \pm 0,30$  mm), a zatim slijede čestice P-IPS < P-R < P-ZK. Očekivano, sustav P-ZK karakteriziran je s najvećom veličinom čestica ( $3,60 \pm 0,30$  mm), zbog korištenja igle većeg promjera (18 G), budući da je prah zelene kave sadržavao veće, netopljive čestice koje nisu mogle proći kroz iglu manjeg promjera, koja se koristila za inkapsulaciju ostalih sustava.

Udjel vode u formuliranim pektinskim česticama određen je iz omjera masa uzoraka prije i nakon sušenja. Najveći udjel vode sadrže čiste pektinske čestice ( $86,73 \pm 0,34$  %), dok je dodatak drugih biopolimera u pektinske sustave nosača rezultirao smanjenim udjelom vode. Razlog tome je što je dodatak drugih materijala u gel mrežu pektina uzrokovao popunjavanje prostora između čestica što je rezultiralo smanjenim udjelom vode u njihovoj hidrogel mreži. Isto zapažanje uočeno je u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Najniži udjel vode sadrže čestice sustava P-ZK ( $84,99 \pm 0,03$  %).

Analizom rezultata tvrdoće, vidljivo je da je najveći utrošak sile (N) za kompresiju bilo potrebno uložiti za čestice sustava P-KP jer je upravo taj sustav pokazao najveću tvrdoću ( $0,20 \pm 0,02$  N). Čestice ostalih binarnih sustava su znatno mekše, od kojih najmanju tvrdoću imaju čiste čestice pektina te one u kombinaciji sa zelenom kavom, obje  $0,11 \pm 0,1$  N.

Što se tiče elastičnosti formuliranih čestica, najmanju elastičnost su pokazale čiste pektinske čestice ( $0,18 \pm 0,01$  mm), dok je dodatak prirodnih materijala u pektinski gel rezultirao je tvorbom znatno elastičnijih čestica. Zanimljivo je da čestice „pojačane“ kakaovim prahom, koje su se pokazale najtvrdim, pokazuju i najveće svojstvo elastičnosti ( $0,36 \pm 0,01$  mm), što je također u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2016).

#### 4.1.2. Usporedba povećanja mase čestica nakon vezanja vode

**Tablica 5.** Omjer povećanja mase nastale uslijed bubrenja u liofiliziranim česticama

NOSAČ	SR <sub>30'</sub>	SR <sub>1h</sub>	SR <sub>2h</sub>	SR <sub>4h</sub>	SR <sub>6h</sub>	SR <sub>24h</sub>
<b>P</b>	4,064±0,029	4,106±0,030	4,015±0,061	3,962±0,054	3,982±0,107	4,153±0,004
<b>P-IPS</b>	4,663±0,013	4,551±0,056	4,049±0,234	3,701±0,160	3,871±0,163	2,460±0,528
<b>P-KP</b>	3,958±0,024	3,330±0,255	2,978±0,592	2,571±0,507	2,094±0,510	1,509±0,763
<b>P-R</b>	4,291±0,166	4,140±0,097	3,754±0,170	3,846±0,196	3,854±0,243	3,407±0,379
<b>P-ZK</b>	4,098±0,306	3,795±0,494	3,202±0,291	2,420±0,018	1,534±0,228	1,021±0,073

U tablici 5 prikazani su rezultati promjene mase liofiliziranih čestica uslijed vezanja vode tijekom 24 h. Oznaka SR, koja je spomenuta u tablici 5, označava skraćenicu za englesku riječ „*Swelling ratio*“, a predstavlja omjer mase čestica nakon određenog vremenskog intervala (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h i 24 h) i početne mase čestica (0,05 g).

S obzirom na dobivene rezultate vidljivo je da se jedino masa čistih pektinskih čestica uz značajne fluktuacije ipak povećala nakon 24 h ( $SR_{24h} = 4,153 \pm 0,004$ ), što znači da su čestice vezale određenu količinu vode tijekom vremena te je došlo do bubrenja. Kod svih čestica binarnih sustava uočeno je smanjenje SR vrijednosti tijekom vremena radi njihove dezintegracije. Najmanji pad vrijednosti SR omjera je zapažen kod sustava P-R ( $SR_{24h} = 3,407 \pm 0,379$ ) i P-IPS ( $SR_{24h} = 2,460 \pm 0,528$ ). Kod binarnih sustava P-KP i P-ZK prvi veći

pad SR omjera je zabilježen već nakon samo 1 h provođenja metode, a isti trend se nastavio do kraja praćenja bubrenja kada su čestice u potpunosti izgubile svoj sferičan oblik i raspale se. Smanjenje mase čestica, a samim time i omjera bubrenja, može se objasniti prestankom difuzije vode u česticu te razgradnjom pektinskog gela. Također, prema Sriamornsak i Nunthanid (1998), tip pektina ima značajan utjecaj na bubrenje čestica. Što je niži DE to je omjer bubrenja kroz vremenski interval niži, a čestice gela su znatno mekše i poroznije, što potvrđuje i rad Awasthi i suradnika (2017) u kojem stoji da stupanj umrežavanja ima negativan utjecaj na svojstva bubrenja, što se pokazalo i u ovom radu.

## 4.2. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem

### 4.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica i udjel vode

**Tablica 6.** Raspodjela veličine čestica i udjel vode

UZORAK	Raspodjela veličine čestica			PSD	Udjel vode
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)	μm	%
	μm	μm	μm		
<b>P</b>	5,85 ± 0,01	30,79 ± 0,77	272,73 ± 0,21	8,67 ± 0,21	7,60 ± 0,06
<b>P-IPS</b>	2,38 ± 0,02	8,98 ± 0,08	116,90 ± 11,47	12,76 ± 1,17	6,42 ± 0,16
<b>P-KP</b>	8,19 ± 0,16	23,80 ± 1,04	254,15 ± 9,64	10,33 ± 0,05	5,76 ± 0,16
<b>P-R</b>	11,21 ± 1,78	81,78 ± 3,26	341,47 ± 1,68	4,04 ± 0,20	8,27 ± 0,24
<b>P-ZK</b>	6,36 ± 0,26	25,34 ± 0,01	238,23 ± 1,56	9,15 ± 0,08	7,08 ± 0,04

Tablica 6 prikazuje parametre raspodjele veličine čistih pektinskih čestica te onih kombiniranih s različitim nosačima. Na temelju podataka može se zaključiti kako je dodatak pojedinih nosača u pektinski sustav znatno utjecao na veličinu mikročestica. Veličina čestica čistog pektina izražena kao d (0,5) iznosi 30,79 ± 0,77 μm, dok se prosječna veličina inkapsuliranih čestica binarnih sustava kretala od 8,98 ± 0,08 μm za čestice sustava P-IPS do 81,78 ± 3,26 μm za pektinske čestice „pojačane“ rogačem. S obzirom na dobivene vrijednosti PSD raspona, vidljivo je da čestice sustava P-IPS imaju najveći PSD raspon (12,76 ± 1,17) što ukazuje na njihovu nehomogenu raspodjelu veličine, dok od ostalih sustava



jedino čestice sustava P-R su približno jednake veličine budući da im je PSD raspon najniži ( $4,04 \pm 0,20$ ) te sukladno tome te čestice imaju najhomogeniju raspodjelu.

Što se tiče udjela vode u formuliranim mikročesticama, najveći udjel vode sadrže čestice karakterizirane najvećom raspodjelom čestica, odnosno sustav P-R ( $8,27 \pm 0,24$  %), dok najmanji udjel vode imaju čestice sustava P-KP ( $5,76 \pm 0,16$  %).

#### 4.2.2. Određivanje topljivosti, močivosti i učinkovitosti otapanja

**Tablica 7.** Toplјivost, močivost i učinkovitost otapanja čestica

	<b>Toplјivost</b>	<b>Močivost</b>	<b>Učinkovitost otapanja</b>
<b>UZORAK</b>	<b>(%)</b>	<b>(h min sek)</b>	<b>(h min sek)</b>
<b>P</b>	$6,11 \pm 0,07$	1' 38"	4' 24"
<b>P-IPS</b>	$7,18 \pm 0,00$	21° 16' 30"	10' 18"
<b>P-KP</b>	$4,85 \pm 0,03$	3' 57"	2' 03"
<b>P-R</b>	$6,78 \pm 0,05$	1' 55"	19' 42"
<b>P-ZK</b>	$6,68 \pm 0,04$	1' 25"	12' 30"

U Tablici 7 prikazani su rezultati metoda koje su provedene radi određivanja fizikalnih svojstava čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem.

Uspoređujući rezultate za toplјivost, dodatak izolata proteina sirutke rezultirao je najvišim postotkom toplјivosti među ispitanim uzorcima ( $7,18 \pm 0,00$  %), dok najmanje toplјiv je bio uzorak P-KP ( $4,85 \pm 0,03$  %). Toplјivost čestica čistog pektina iznosi  $6,11 \pm 0,07$  %.

Uspoređujući rezultate za određivanje močivosti, može se zaključiti kako su se čestice gotovo svih sustava vrlo brzo „potopile“. U prosjeku je bilo potrebno oko 2 minute da sve čestice uzorka padnu na dno čaše, osim u slučaju sustava P-IPS kod kojeg su se čestice zadržale na površini vode dulje od 21 sat.

Dodatak prirodnih materijala u pektinski sustav nosača je rezultirao duljim vremenom otapanja u odnosu na čisti pektinski sustav, osim u slučaju dodatka kakovog praha. Unatoč tome, gotovo svi sustavi imaju odličnu učinkovitost otapanja od svega nekoliko minuta, osim sustava P-R koji značajnije odstupa, jer je za njegovo potpuno otapanje bilo potrebno gotovo 20 minuta.

### 4.2.3. Određivanje nasipne gustoće, kohezivnosti i tecivosti

**Tablica 8.** Svojstva tečenja uzoraka dobivenih sušenjem raspršivanjem

	Nasipna gustoća	HR	Carr indeks
<b>UZORAK</b>	<b>(kg/m<sup>3</sup>)</b>		
<b>P</b>	237,97 ± 9,23	1,72 ± 0,04	41,77 ± 1,21
<b>P-IPS</b>	241,09 ± 7,06	1,56 ± 0,06	35,75 ± 2,46
<b>P-KP</b>	212,94 ± 7,23	1,59 ± 0,03	37,23 ± 1,23
<b>P-R</b>	217,08 ± 7,02	1,40 ± 0,01	28,78 ± 0,55
<b>P-ZK</b>	289,83 ± 12,56	1,57 ± 0,02	36,33 ± 0,73

Uzorcima koji su dobiveni metodom sušenja raspršivanjem određena su svojstva tečenja. U tablici 8, za svaki sustav nosača, prikazana je odgovarajuća nasipna gustoća na temelju koje su određena svojstva kohezivnosti (Hausnerov omjer) i svojstva tečenja (Carr indeks).

Analizom podataka uočeno je da se nasipna gustoća čestica binarnih sustava znatno razlikuje od nasipne gustoće čestica čistog pektina. Na temelju prikazanih podataka, vidljivo je da uzorak čistog pektina ima nasipnu gustoću  $237,97 \pm 9,23 \text{ kg/m}^3$ . Pektinske čestice „pojačane“ zelenom kavom imaju najveću nasipnu gustoću  $289,83 \pm 12,56 \text{ kg/m}^3$ , dok čestice sustava P-KP imaju najnižu ( $217,08 \pm 7,02 \text{ kg/m}^3$ ). Takva povećana devijacija u odnosu na vrijednost čistog pektina je u skladu s radom Şahin Nadeem (2011) u kojem se navodi kako vrsta nosača izravno utječe na vrijednost nasipne gustoće prahova.

Što se tiče vrijednosti kohezivnosti, najveću imaju čestice čistog pektina ( $1,72 \pm 0,04$ ) što ovaj uzorak zajedno sa sustavima P-IPS, P-KP i P-ZK svrstava u kategoriju visoke kohezivnosti čestica. Hausnerov omjer sustava P-R iznosi  $1,40 \pm 0,01$  te iako je granična vrijednost, ipak spada u kategoriju srednje kohezivnosti čiji je raspon 1,2 – 1,4.

Prema Carr indeksu gotovo svi sustavi nosača spadaju u kategoriju loše tecivosti, od kojih sustav čistog pektina prednjači ( $41,77 \pm 1,21$ ), a jedino sustav P-R, čiji Carr indeks iznosi  $28,78 \pm 0,55$ , spada u skupinu prahova s dovoljnom tecivošću.

### 4.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem

**Tablica 9.** Parametri boje hidrogel čestica i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem

	UZORAK	L*	a*	b*	$\Delta E^*$
IONSKO GELIRANJE	P	29,17 ± 0,13	8,28 ± 0,01	21,66 ± 0,11	-
	P-IPS	37,02 ± 0,08	8,52 ± 0,04	25,36 ± 0,30	8,69 ± 0,20
	P-KP	21,92 ± 0,10	9,80 ± 0,05	15,26 ± 0,02	9,79 ± 0,06
	P-R	23,14 ± 0,07	10,23 ± 0,09	18,04 ± 0,52	7,32 ± 0,22
	P-ZK	29,72 ± 0,36	9,06 ± 0,06	23,19 ± 0,16	1,85 ± 0,08
	SUŠENJE RASPRŠIVANJEM	P	63,92 ± 0,27	4,20 ± 0,03	27,22 ± 0,11
P-IPS		78,53 ± 0,42	1,30 ± 0,10	20,38 ± 0,21	16,39 ± 0,48
P-KP		48,67 ± 0,09	11,13 ± 0,02	25,66 ± 0,06	16,82 ± 0,08
P-R		57,70 ± 0,20	6,43 ± 0,04	26,86 ± 0,09	6,62 ± 0,19
P-ZK		66,05 ± 0,42	4,63 ± 0,09	28,69 ± 0,05	2,65 ± 0,30

U tablici 9 prikazani su podaci o izmjerenim parametrima boje za hidrogel čestice i čestice dobivene sušenjem raspršivanjem. Parametri boje izmjereni su u SCI (eng. „*Specular Component Included*“) modu, a vrijednosti L\* označavaju svjetlinu uzorka, vrijednosti a\* odnose se na parametre boje uzorka za crveno, vrijednosti b\* odnose se na parametre boje uzorka za žuto, a česticama pektina koje su „pojačane“ s dodatkom IPS, KP, R i ZK izmjerena je i ukupna promjena boje  $\Delta E^*$  u odnosu na referentni uzorak (čestice koje sadrže isključivo pektin).

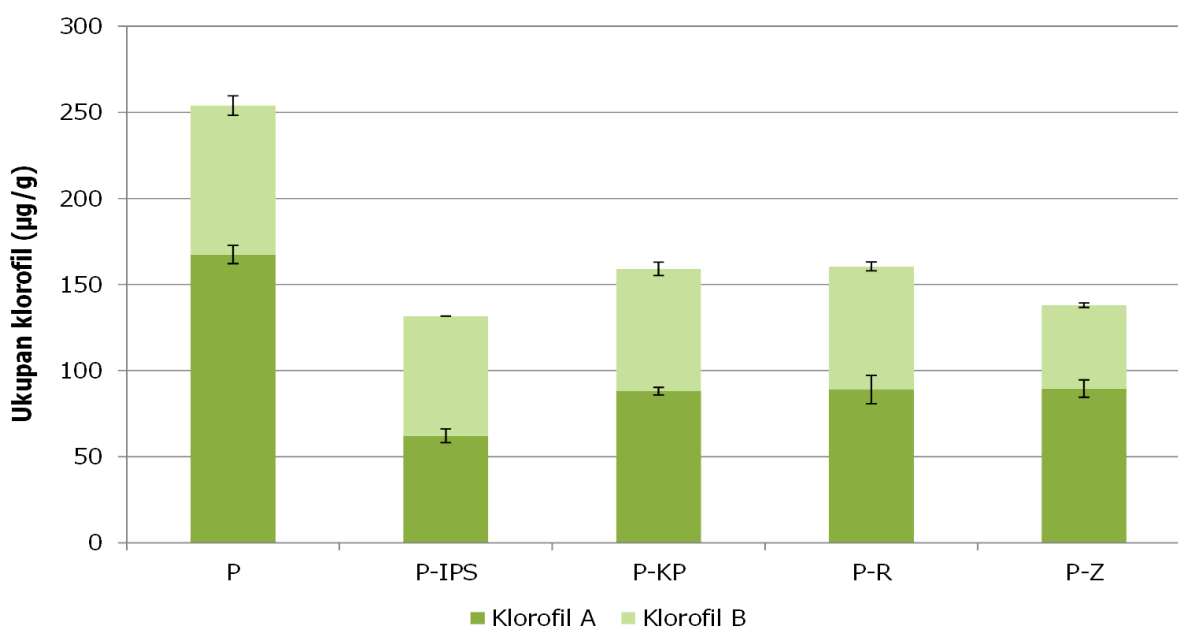
Uvidom u rezultate za svjetlinu hidrogel čestica vidljivo je da je dodatak kakaovog praha rezultirao najnižom L\* vrijednošću (21,92 ± 0,10), te je time karakteriziran kao najtamniji. Čestice sustava P-IPS su najsvjetlije (37,02 ± 0,08). Kod čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem uočen je isti poredak, najtamnije su čestice sustava P-KP (48,67 ± 0,09), a najsvjetlije one sustava P-IPS (78,53 ± 0,42). Uspoređujući sve uzorke nosača vidljivo je da su čestice pripravljene sušenjem raspršivanjem svjetlije u odnosu na hidrogel čestice, budući da imaju više L\* vrijednosti.

Kod hidrogel čestica, najveća vrijednost parametra  $a^*$  je detektirana kod sustava P-R ( $10,23 \pm 0,09$ ), dok najslabije izraženo crveno obojenje je prisutno kod čestica čistog pektina ( $8,28 \pm 0,01$ ). Kod uzorka dobivenih sušenjem raspršivanjem, najveću vrijednost parametra  $a^*$  ima sustav P-KP ( $11,13 \pm 0,02$ ), što upućuje na najjače izraženo crveno obojenje, dok kod drugih sustava je ta vrijednost znatno niža.

Vrijednost parametra  $b^*$  kod hidrogel čestica najveća je kod sustava P-IPS ( $25,36 \pm 0,30$ ) i upućuje na izraženije žuto obojenje uzorka, dok isti sustav dobiven sušenjem raspršivanjem ima najnižu vrijednost žutog obojenja,  $20,38 \pm 0,21$ .

$\Delta E^*$  predstavlja ukupnu vrijednost razlike u boji između ispitanog i kontrolnog uzorka. Prema Obon i suradnicima (2009), kada se vrijednost  $\Delta E^*$  nalazi u rasponu od 1,5 do 5 promjenu u boji je moguće, ali teže uočiti, no kada je taj parametar veći od 5, razlika je očita. Najveća ukupna promjena boje ( $\Delta E^*$ ) uočena je kod čestica sustava P-KP i to za obje inkapsulacijske tehnike ( $P-K_{IG} = 9,79 \pm 0,06$ ;  $P-K_{SR} = 16,82 \pm 0,08$ ). Zatim slijede sustavi P-IPS s neznatno manjom vrijednošću ( $P-IPS_{IG} = 8,69 \pm 0,20$ ;  $P-IPS_{SR} = 16,39 \pm 0,48$ ), što je i za očekivati, jer se upravo ti sustavi čestica (P-KP i P-IPS) bojom najviše razlikuju od referentnog uzorka (čestica čistog pektina). Najmanju ukupnu promjenu u boji, kod obje inkapsulacijske tehnike, pokazuju pektinski sustavi „pojačani“ dodatkom zelene kave.

#### 4.4. Određivanje udjela klorofila u česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem

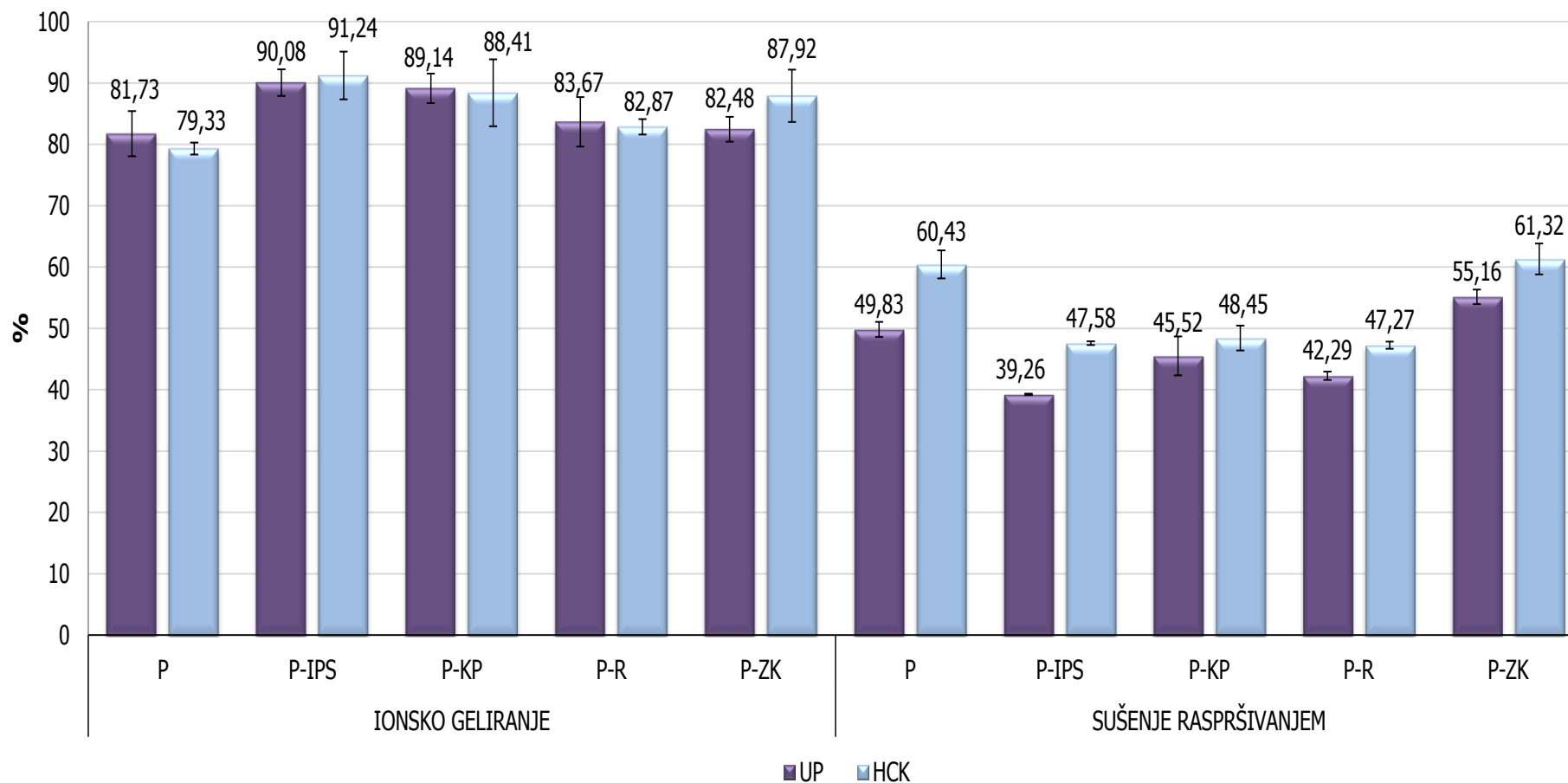


**Slika 7.** Udjel klorofila ( $\mu\text{g/g}$ ) u česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem

Na slici 7 nalazi se grafički prikaz udjela klorofila izraženog kao zbroj klorofila a i klorofila b ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima dobivenim sušenjem raspršivanjem. Klorofil a predstavlja klorofilni pigment koji apsorbira na valnoj duljini od  $\lambda = 663 \text{ nm}$ , dok klorofil b apsorbira na valnoj duljini od  $\lambda = 645 \text{ nm}$ .

Analizirajući podatke provedene analize, vidljivo je kako među ispitanim uzorcima, čestice čistog pektina sadrže najviše klorofila, čak  $253,96 \mu\text{g/g}$  uzorka, od čega 65 % čini klorofil a. Kod svih binarnih sustava uočena je znatno manja količina klorofila. Najmanje klorofila sadrže čestice sustava P-IPS, samo  $131,70 \mu\text{g/g}$  uzorka, uz neznatno veću količinu klorofila b, 53%. Zatim slijedi sustav P-ZK koji sadrži  $138,04 \mu\text{g/g}$  uzorka, od čega  $89,53 \mu\text{g/g}$  čini klorofil a. Kod sustava P-KP i P-R uočena je vrlo slična raspodjela klorofila a i b u uzorcima. Oba uzorka sadrže oko  $160 \mu\text{g}$  klorofila/g uzorka, od čega kod oba sustava 56 % otpada na klorofil a, a 44 % na klorofil b. Dobivene rezultate potvrđuje istraživanje Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), u kojem također sustavi s nosačima u koje su dodani proteini i ostali hidrokoloide su pokazali manju sposobnost zadržavanja spojeva iz ekstrakta zelenog čaja koji apsorbiraju u UV/Vis djelu spektra. U skladu s tim, u ovom radu korištenjem dodatnih materijala u kombinaciji s pektinom, dobivene su čestice s nižim sadržajem klorofila od čestica kod kojih je kao nosač korišten isključivo pektin.

#### 4.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem

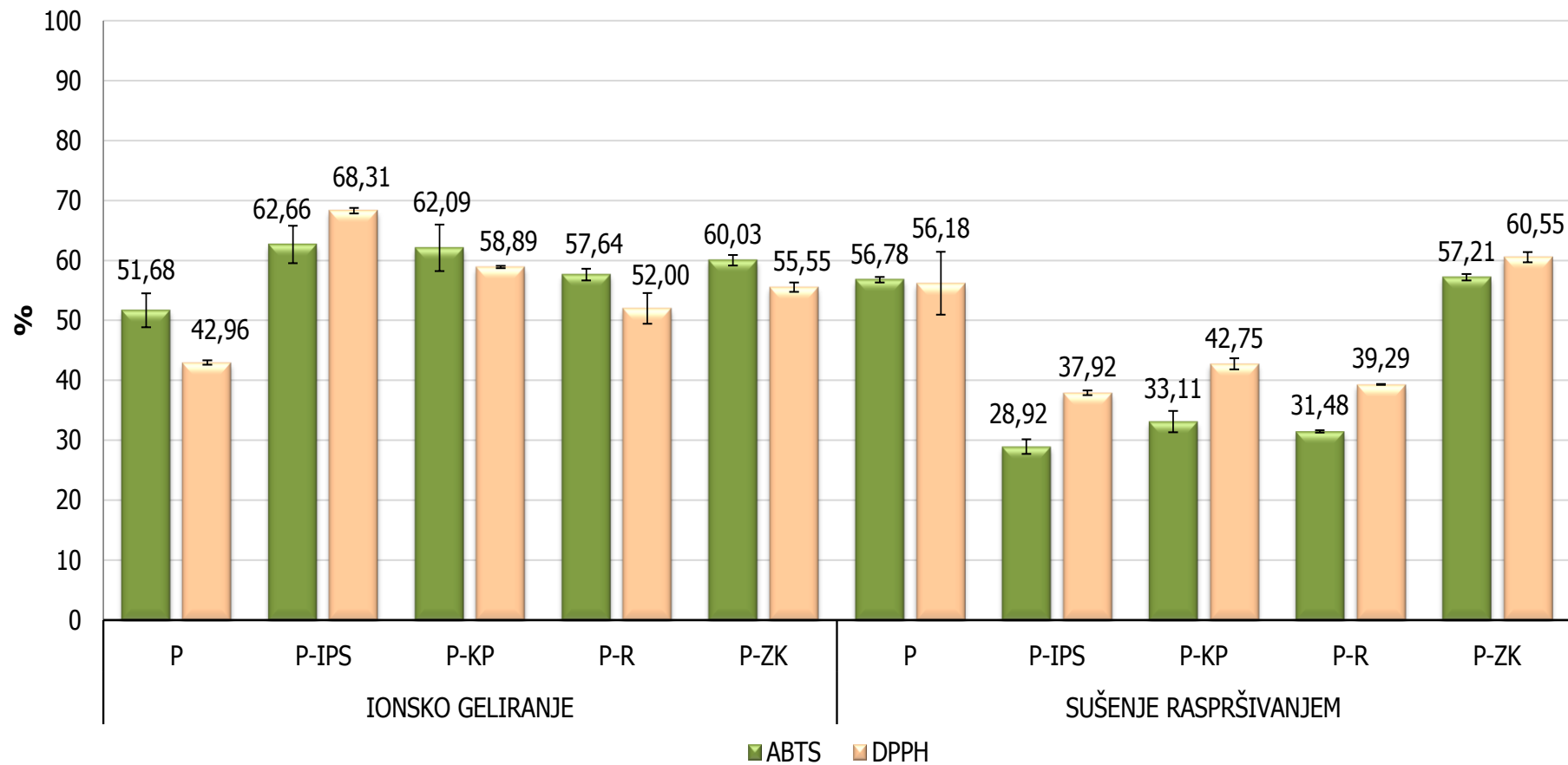


**Slika 8.** Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (HCK) u hidrogel česticama i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

Na slici 8 nalazi se grafički prikaz inkapsulacijske učinkovitosti (%) ukupnih polifenola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u hidrogel česticama i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem.

Usporedbom učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola u različitim sustavima hidrogel čestica, vidljivo je kako svi sustavi pokazuju visoki stupanj inkapsulacije ukupnih polifenola, iznad 80 %. Među ispitanim sustavima, najniži stupanj inkapsulacije imao je sustav s čistim pektinom (81,73 %), koji je karakteriziran i najmanjom veličinom čestica. Takav proporcionalan odnos između stupnja inkapsulacije i veličine čestica je potvrđen u radu Bušić i suradnika (2016). Zbog porozne strukture pektinskih hidrogel čestica te nižeg stupnja inkapsulacije bioaktivnih spojeva (Tello i sur., 2014), noviji pristup u tehnici ionskog geliranja se bazira na upotrebi hidrofilnih otopina nosača u kombinaciji s drugim materijalima, što rezultira stvaranjem višeslojnih mikročestica s boljim kapacitetom zadržavanja aktivne tvari, većim prinosom i boljom inkapsulacijskom učinkovitošću (Vasille i sur., 2018). Među binarnim sustavima, dodatak izolata proteina sirutke rezultirao je najvišim stupnjem inkapsulacije polifenola (90,8 %). Uspješna ugradnja polifenola u sustav nosača s izolatima proteina sirutke se može objasniti povećanim afinitetom polifenola prema proteinima i stvaranjem kompleksa protein-polifenoli i protein-polisaharid (Belščak-Cvitanović i sur., 2016). Ostali binarni sustavi pokazali su nešto niži postotak inkapsulacije, P-KP (89,14 %) > P-R (83,67 %) > P-ZK (82,48 %). Sličan trend je uočen i kod imobilizacije ukupnih hidroksicimetnih kiselina, gdje je također binarni sustav s dodatkom izolata proteina sirutke prednjačio s visokih 91,24 %, a zatim su slijedili sustavi P-KP (88,41 %) > P-ZK (87,92 %) > P-R (82,87 %).

U odnosu na ionsko gelirane čestice, čestice dobivene tehnikom sušenja raspršivanjem imale su niži postotak imobilizacije ukupnih polifenola maslačka, koji se kretao od 39,26 % za pektinski sustav pojačan izolatima proteina sirutke do 55,16 % za sustav P-ZK. Zanimljivo je da su svi binarni sustavi (osim sustava P-ZK) pokazali niži stupanj imobilizacije ukupnih polifenola od čistog pektina (49,83 %). U slučaju imobilizacije ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ponovno je sustav P-ZK pokazao najveći postotak zadržavanja HCK (61,32 %) što ukazuje na visoki potencijal zelene kave kao dodatnog materijala u sustavu nosača za inkapsulaciju ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina. Svi ostali binarni sustavi imaju manju sposobnost zadržavanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina od čestica čistog pektina (60,43 %).



**Slika 9.** Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metoda u hidrogel česticama i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem s inkapsuliranim ekstraktom maslačka

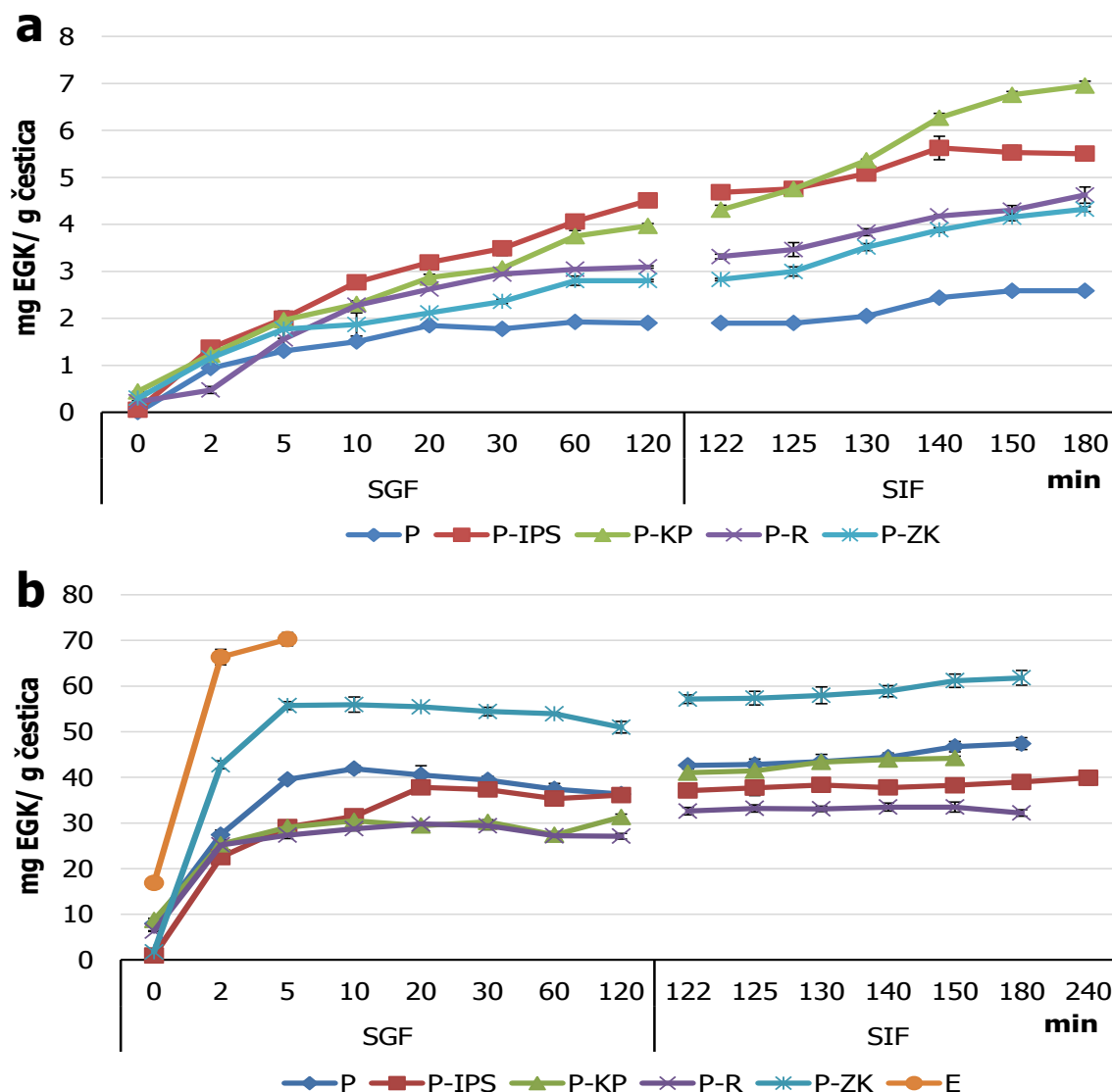


Sposobnost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama i česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem koje sadrže inkapsulirani ekstrakt maslačka je određena ABTS i DPPH metodama, a prikazana na slici 9.

Obradom dobivenih rezultata, uočen je isti trend zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama kao i kod imobilizacije ukupnih polifenola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, s obzirom da podaci za imobilizaciju ukupnih polifenola i HCK dobro koreliraju s podacima o sposobnosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta. Također je dodatak pomoćnih materijala u pektinski sustav nosača povećao učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode, koja u padajućem nizu iznosi: P-IPS (62,66 %) > P-KP (62,09 %) > P-ZK (60,03 %) > P-R (57,64 %). Isti poredak uočen je i primjenom DPPH metode, gdje je opet najveću učinkovitost pokazao je sustav P-IPS (68,31 %), a najmanju sustav P (42,96 %). Rezultati su u skladu s istraživanjem Bušić i suradnika (2016) gdje, iako je kao nosač korišten alginat, dodatak izolata proteina sirutke je rezultirao najvećim antioksidacijskim kapacitetom. Uspoređujući metode, ABTS metoda je pokazala bolje zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta u svim sustavima hidrogel čestica (osim kod sustava P-IPS) u odnosu na DPPH metodu, što i ne iznenađuje s obzirom da ABTS radikal reagira s hidrofilnim i lipofilnim antioksidansima, dok DPPH radikal reagira samo s lipofilnim (Prior i sur., 2005).

U slučaju određivanja antioksidacijskog kapaciteta u česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem uočen je suprotan trend od onog kod hidrogel čestica. Primjenom ABTS metode, čestice sustava P-IPS pokazale su vrlo nisku sposobnost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta (28,92 %), dok su čestice sustava P imale imale znatno veći postotak zadržavanja istog, 56,78 %. Primjenom DPPH metode, sustavi P-ZK (60,55 %) i P (56,18 %) pokazali su visok stupanj zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, dok sustav P-IPS vrlo nizak (37,92 %).

#### 4.6. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem s inkapsuliranim ekstraktom maslačka



**Slika 10.** Profili otpuštanja ukupnih polifenola (mg EGK/g čestica) iz hidrogel čestica (a) i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) s inkapsuliranim ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima

Na slici 10 prikazani su profili otpuštanja ukupnih polifenolnih spojeva iz pektinskih čestica dobivenih ionskim geliranjem (a) i sušenjem raspršivanjem (b) u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, pri 37 °C.

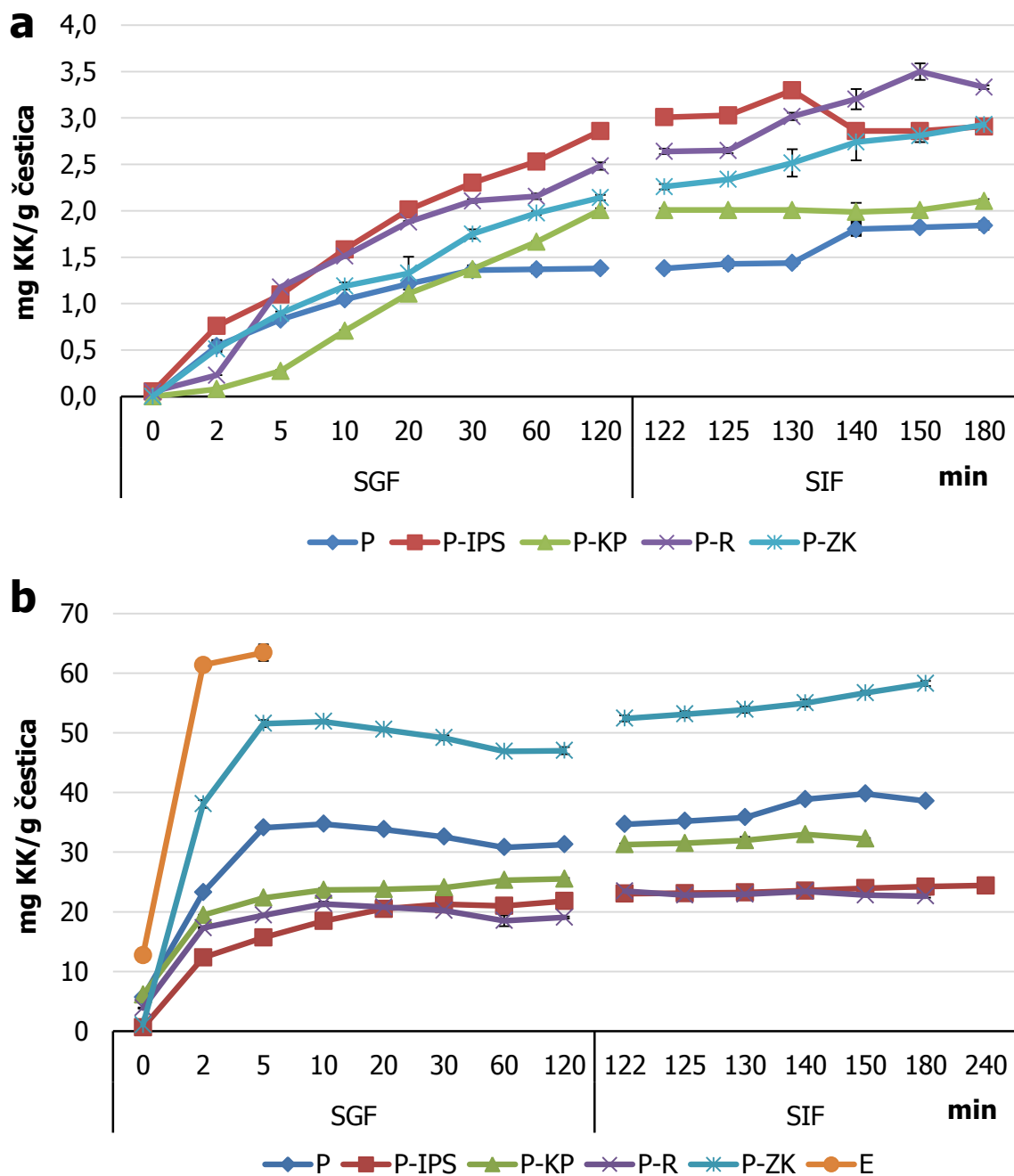
Usporedbom profila otpuštanja ukupnih polifenolnih spojeva iz različitih sustava hidrogel čestica (a), vidljivo je da zbog porozne strukture, najbrže otpuštanje ukupnih

polifenola pokazuje sustav s čistim pektinom. U tom slučaju, otpuštanje polifenola se odvijalo kontinuirano do 20. minute u uvjetima SGF-a, nakon čega je zapažen period stacionarnog stanja koji se nastavio i nakon prebacivanja čestica u SIF (uz manje fluktuacije), gdje je nakon 180. minuta otpušteno svega 2,59 mg EGK/g čestica. Najpoželjniji profil otpuštanja imao je sustav s dodatkom kakaovog praha jer se otpuštanje polifenola iz čestica odvijalo postupno tijekom svih 120. minuta u SGF-u, nakon čega je također uslijedilo produženo otpuštanje u SIF-u do ukupno 180. minute s količinom otpuštenih polifenola od čak 6,95 mg EGK/g čestica. U radu Bušić i suradnika (2018), iako je kao nosač korišten alginat, također je dodatak kakaovog praha rezultirao najsporijim otpuštanjem ukupnih polifenola iz hidrogel čestica. K tome, veći sadržaj polifenola u sustavu P-KP se može pripisati prirodno prisutnim polifenolnim spojevima u kakaovom prahu. U ovom slučaju čak 24 % otpuštenih polifenolnih spojeva prirodno potječe iz kakaovog praha što hidrogel čestice dodatno obogaćuje polifenolima. Također, binarni sustavi s rogačem i zelenom kavom su se pokazali pogodnim za inkapsulaciju polifenola s obzirom da je njihovo otpuštanje bilo kontinuirano kroz svih 180. minuta. Iz čestica „pojačanih“ dodatkom rogača tijekom analize se otpustilo 4,62 mg EGK/g čestica (no, 20 % otpuštenih polifenolnih spojeva prirodno potječe iz rogača), dok se iz sustava sa zelenom kavom otpustilo 4,32 mg EGK/g čestica, od čega je 6 % otpuštenih polifenola prirodno prisutno u zelenoj kavi. Dodatak izolata proteina sirutke u pektinski nosač omogućio je kontinuirano otpuštanje polifenola u gastričnom fluidu, a u SIF-u, isti se trend nastavio do 140. minute, nakon čega je uslijedilo stacionarno stanje. Ukupno se otpustilo 5,50 mg EGK/g čestica, što izolate proteina sirutke također svrstava u prirodne materijale koji značajno mogu usporiti oslobađanje bioaktivnih spojeva iz pektinskih hidrogel čestica.

Na slici 10 također je prikazan profil otpuštanja ukupnih polifenola iz čestica pektinskih sustava nosača i čestica ekstrakta dobivenih sušenjem raspršivanjem (b). Čestice ekstrakta sadržavale su velik udio polifenolnih spojeva (70,26 mg EGK/g čestica), koji su se upotpunosti otpustili iz čestica u prvih 5. minuta. Stoga, kako bi se omogućilo sporije i kontinuirano otpuštanje ukupnih polifenola ekstrakta maslačka, isti su imobilizirani u pektinske sustave nosača. Iz čestica s nosačem od čistog pektina ukupni polifenoli su se otpuštali u SGF-u do 10. minute, a zatim je uočen blagi pad u udjelu otpuštenih polifenola. Prebacivanjem u intestinalni fluid, prevladavalo je uravnoteženo stanje uz neznatne fluktuacije s ukupnom količinom otpuštenih polifenola od 47,38 mg EGK/g čestica. Pektinski sustav s dodatkom izolata proteina sirutke se pokazao najboljim sustavom što se tiče profila otpuštanja ukupnih polifenola, s obzirom da je otpuštanje ukupnih polifenola iz čestica bilo duže nego kod ostalih ispitanih sustava te je trajalo 240. minuta. Pektinski sustavi pojačani dodatkom kakaovog praha i rogača u gastričnom fluidu su imali gotovo jednak trend u

otpuštanju ukupnih polifenola, koji je bio kontinuiran prvih 10. minuta, a zatim je uslijedilo ravnotežno stanje koje se nastavilo i nakon prebacivanje u SIF. Ipak, bolji profil otpuštanja uočen je kod sustava s dodatkom rogača jer je otpuštanje trajalo do 180. minute, a kod čestica sustava P-KP do 150. minute. Što se tiče sustava s dodatkom zelene kave, uočeno je naglo otpuštanje ukupnih polifenola iz čestica u prvih 5. minuta, nakon čega je uslijedio pad u vrijednosti otpuštenih ukupnih polifenola. Nakon prebacivanja spomenutih čestica u SIF, uslijedilo je kontinuirano otpuštanje te je ukupno otpušteno 61,81 mg EGK/g čestica.

S obzirom da je cilj spriječiti degradaciju i bioraspoloživost polifenola u probavnom sustavu te smanjiti njihovo brzo otpuštanje iz porozne strukture pektina, u pektinske nosače se dodaju prirodni materijali kako bi se omogućilo dugotrajnije otpuštanje bioaktivnih spojeva u organizmu. Iz dobivenih podataka je vidljivo kako sustavi dobiveni ionskim geliranjem imaju bolji profil otpuštanja polifenolnih spojeva od onih dobivenih sušenjem raspršivanjem, s obzirom da kod spomenutih sustava postoji postupno otpuštanje polifenolnih spojeva u SGF fluidu, nakon čega slijedi produženo otpuštanje u SIF-u, dok kod čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem više od 65% ukupnih inkapsuliranih polifenola se otpusti već nakon 5. minuta. Kao moguće objašnjenje prethodno spomenutog navodi se u radu Lee i suradnika (2009), gdje stoji da praškaste čestice s inkapsuliranim spojevima u doticaju s SGF fluidom napuknu te dolazi do naglog početnog oslobađanja bioaktivnih spojeva sve dok ne nabubre i postignu određenu formu što dalje omogućuje sporo otpuštanje inkapsuliranog spoja. Osim toga, kao moguća posljedica boljeg profila zadržavanja ukupnih polifenola u česticama čistog pektina u odnosu na binarne sustave dobivene sušenjem raspršivanjem (izuzev sustava P-ZK), se može navesti činjenica da je prilikom pripreme binarnih sustava otopina pektina bila pomiješana s 20 % otopinama prirodnih materijala u omjeru 80:20 što je razrijedilo otopinu pektina i utjecalo na formiranje čestica za vrijeme atomizacije u uređaju za sušenje raspršivanjem. Također, obradom podataka uočeno je kako čestice dobivene sušenjem raspršivanjem sadrže veći udjel polifenola, budući da su čestice u formi praha pa su uzorci samim time koncentriraniji.



**Slika 11.** Profil otpuštanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg KK/g čestica) iz hidrogel čestica (a) i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) s inkapsuliranih ekstraktom maslačka u SGF i SIF fluidima

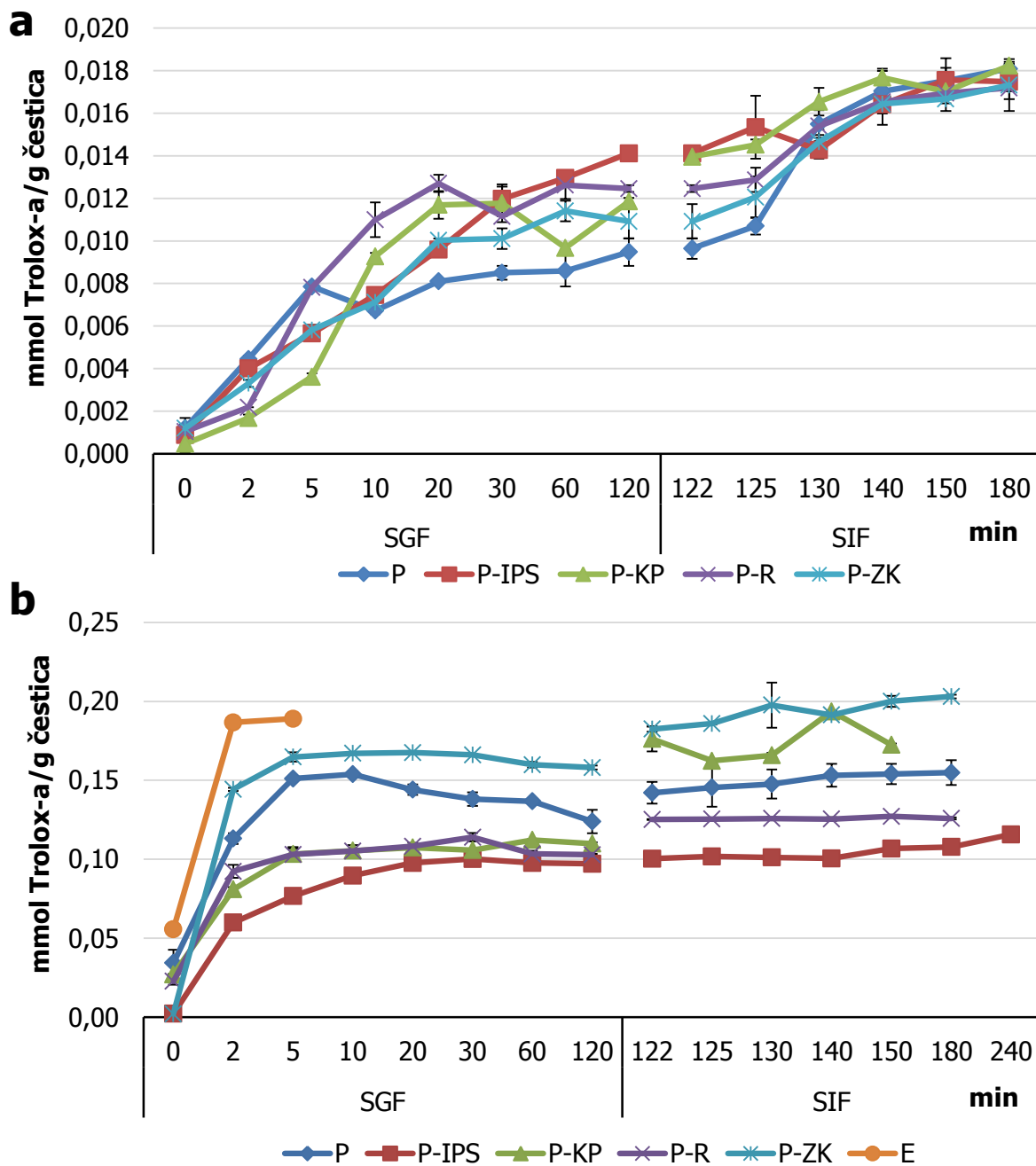
Profili otpuštanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina iz hidrogel čestica (a) i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) prikazani su na slici 11.

Analizirajući profil otpuštanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina iz hidrogel čestica (a), vidljivo je da, kao i kod otpuštanja ukupnih polifenola, i ovdje se ukupne hidroksicimetne

kiseline najbrže otpuštaju iz čistih pektinskih čestica, dok su pektinski sustavi pojačani dodatkom prirodnih materijala imali poželjniji profil otpuštanja. To se može objasniti većim afinitetom hidroksicimetnih kiselina prema polisaharidima i biopolimerima što je omogućilo njihovo bolje zadržavanje u mreži gel čestica. Isto je potvrđeno u radu Trifković i suradnika (2015) gdje su hidroksicimetne kiseline, iz ekstrakta timijana inkapsulirane u čestice na bazi kitozana kao nosača, sporije otpuštene u okolinu zbog jakih interakcija između hidroksilnih grupa hidroksicimetnih kiselina i aminogrupa iz kitozana. „Jačanje“ pektinskog nosača dodatkom rogača i zelene kave, je rezultiralo kontinuiranim otpuštanjem ukupnih hidroksicimetnih kiselina kroz svih 180. minuta u simuliranom gastrointestinalnom fluidu, s udjelom otpuštenih ukupnih hidroksicimetnih kiselina od 3,33 mg KK/g čestica za sustav P-R i 2,93 mg KK/g čestica za sustav P-ZK. Što se tiče binarnog sustava s dodatkom kakaovog praha, zabilježeno je kontinuirano otpuštanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina u SGF fluidu kroz svih 120. minuta te je u tom periodu otpušteno 2,01 mg KK/g čestica, no prebacivanjem u SIF nije zabilježeno značajnije otpuštanje istih, s obzirom da je u SIF-u otpušteno samo 0,11 mg KK/g čestica. Od ukupnih hidroksicimetnih kiselina otpuštenih iz čestica sustava P-KP, 34% je bilo prirodno prisutno u kakaovom prahu. U slučaju sustava P-IPS, dodatak izolata proteina sirutke je usporio otpuštanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina u gastričnim uvjetima te krivulja prikazuje kontinuirani rast, no prebacivanjem u SIF, u 140. minuti je došlo do značajnije fluktuacije i pada udjela otpuštenih hidroksicimetnih kiselina.

Iz profila otpuštanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina iz čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b), vidljiv je vrlo sličan trend kao i kod otpuštanja ukupnih polifenola iz istih sustava. Što se tiče čestica ekstrakta dobivenih sušenjem raspršivanjem, raspale su se već nakon 5. minuta, stoga su ukupne hidroksicimetne kiseline maslačka inkapsulirane u pektinske sustave nosača. Iz čestica čistog pektinskog sustava ukupne hidroksicimetne kiseline su se naglo otpustile do 5. minute, a zatim je uslijedio pad, no nakon prebacivanja čestica u SIF vidljiv je blagi kontinuirani porast u količini otpuštenih ukupnih hidroksicimetnih kiselina u okolinu (38,56 mg KK/g čestica). Otpuštanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina iz sustava P-IPS i P-R u gastričnom fluidu je bilo približno jednako uz manje fluktuacije (za P-IPS je iznosilo 21,80 mg KK/g čestica, dok za P-R 19,06 mg KK/g čestica), no nakon prebacivanja u SIF nije više zabilježena značajnija promjena u vrijednosti otpuštenih ukupnih hidroksicimetnih kiselina, iako je otpuštanje za čestice sustava P-IPS trajalo čak 240. minuta. Kod sustava s dodatkom zelene kave uočeno je naglo otpuštanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina iz čestica u prvih 5. minuta u gastričnom fluidu te je zatim nastavljen blagi pad. Prebacivanjem u SIF, vidljiv je kontinuiran porast u količini otpuštenih ukupnih hidroksicimetnih kiselina te je u 180. minuti otpušteno visokih 58,28 mg KK/g čestica.

Na temelju rezultata, vidljivo je kako se otpuštanje hidroksicimetnih kiselina iz čestica dobivenih ionskim geliranjem u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima odvija kontinuirano i sporo, za razliku od čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem, iz kojih se već u prvih 5. minuta otpusti minimalno 64% ukupnih inkapsuliranih hidroksicimetnih kiselina.



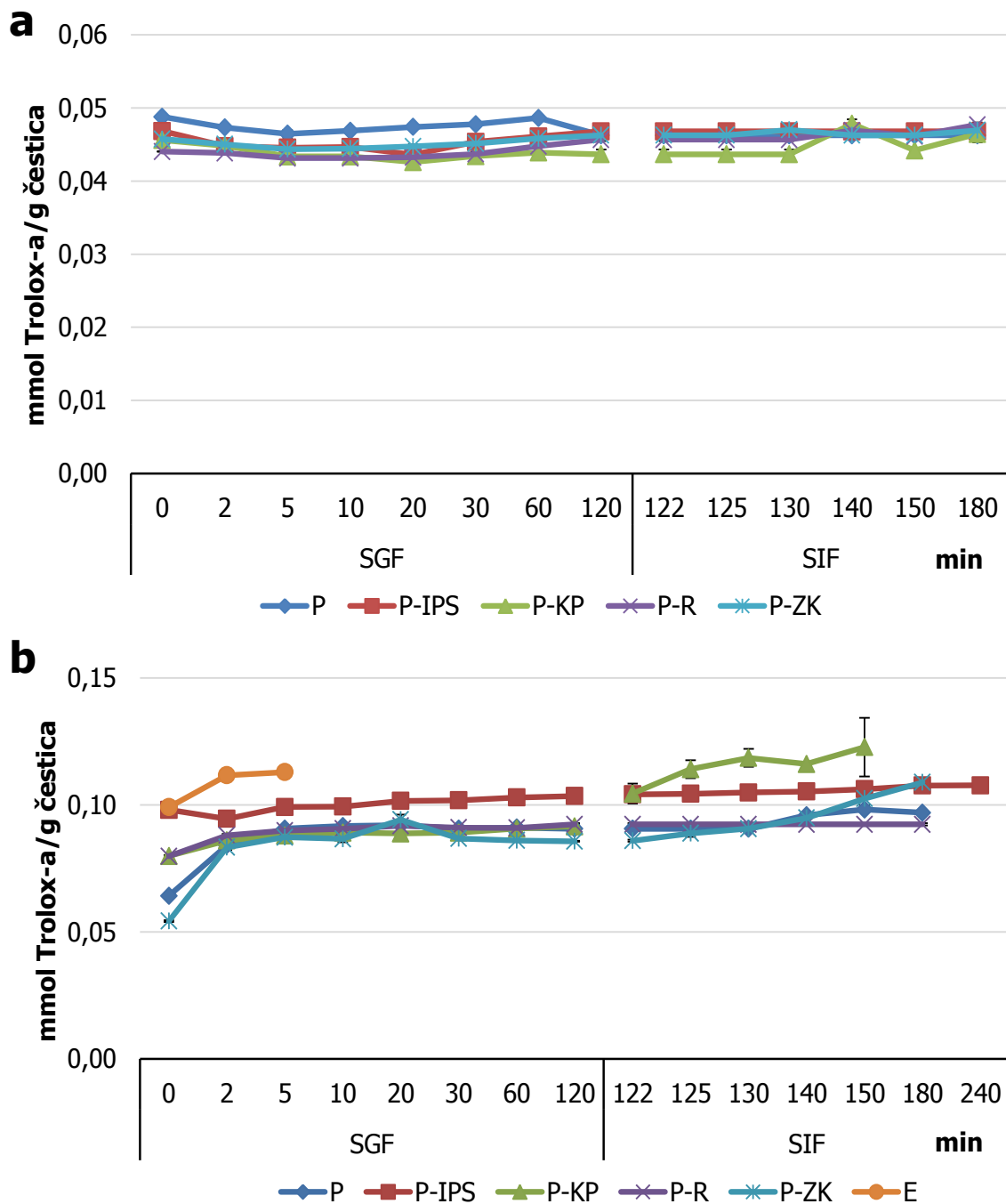
**Slika 12.** Profili otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz hidrogel čestica (a) i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) s inkapsuliranim ekstraktima maslačka u SGF i SIF fluidima primjenom ABTS metode

Slika 12 prikazuje kinetiku otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica (a) i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima primjenom ABTS metode.



Iz rezultata za otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica (a) je vidljivo da su svi binarni sustavi s pektinom kao bazom uspješno usporili otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima u usporedbi s čistim pektinom kao nosačem. Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica čistog pektina se odvijalo kontinuirano u SGF-u (uz značajniju fluktuaciju u 10. minuti), a isti trend otpuštanja se nastavio i u SIF-u do kraja analize (0,018 mmol Trolox-a/g čestica). Sustavi P-IPS i P-ZK kroz cijelo vrijeme otpuštanja u gastričnim uvjetima su imali poželjan kontinuiran profil otpuštanja (s nešto većim udjelom otpuštenog antioksidacijskog kapaciteta iz čestica sustava P-IPS), a isti trend se nastavlja i prebacivanjem čestica u SIF uz manju fluktuaciju u 130. minuti za sustav P-IPS. Što se tiče sustava P-KP i P-R, antioksidacijski kapacitet se kontinuirano otpuštao sve do 20. minute, uz značajniji pad vrijednosti u 30. minuti za sustav P-R te u 60. minuti za sustav P-KP. Prebacivanjem čestica oba sustava u intestinalni fluid uočeno je uglavnom kontinuirano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta do kraja analize.

Iz grafičkog prikaza za otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) vidljivo je da je ponovno otpuštanje iz čestica ekstrakta bilo naglo. Najlošiji profil otpuštanja među sustavima nosača pokazale su čestice čistog pektina, budući da u prvih 10. minuta otpuštanja u gastričnom fluidu čestice sustava P otpuste 99% ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u okolinu. Binarni sustavi imaju poželjnije profile otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta, od kojih sustav P-ZK prednjači. Najveći porast u vrijednosti otpuštenog antioksidacijskog kapaciteta uočen je kod čestica sustava P-KP, gdje je nakon uravnoteženog stanja u SGF-u otpušteno 0,110 mmol Trolox-a/g čestica, no prebacivanjem čestica u SIF, vrijednost ukupnog otpuštenog antioksidacijskog kapaciteta je naglo porasla na 0,172 mmol Trolox-a/g čestica. Sustavi P-R i P-IPS imaju gotovo isti profil otpuštanja hidrosicimetnih kiselina, pri čemu je u oba slučaja zamijećeno kontinuirano otpuštanje kroz 30. minuta u SGF-u, nakon čega se uspostavi ravnotežno stanje koje se nastavlja i nakon prebacivanja čestica u SIF.



**Slika 13.** Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz hidrogel čestica (a) i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) s inkapsuliranim ekstraktom maslačka primjenom DPPH metode

Slika 13 prikazuje kinetiku otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica (a) i čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima primjenom DPPH metode.

Primjenom DPPH metode otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica (a) se odvija vrlo brzo kod svih ispitanih sustava, pri čemu se brzo postiže uravnoteženo stanje, uz neznatne fluktuacije. Samo kod sustava s čistim pektinom zamijećeno je neznatno kontinuirano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u gastričnom fluidu (0,046 mmol Trolox-a/g čestica). Prema radu Lozano-Varez i suradnika (2015), brzo otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta je posljedica erozije i slabljenja strukture polisaharidnog gela zbog hidrolize u kiselim gastrointestinalnim uvjetima.

Iz grafičkog prikaza za otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (b) vidljivo je da su se čestica ekstrakta raspale nakon 5. minuta. Sustavi P-IPS i P-R već nakon 2. minute postižu uravnoteženo stanje koje se nastavlja do kraja analize. Sustav P-ZK do 2. minute pokazuje naglo otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta, nakon čega slijedi uglavnom uravnoteženo stanje koje se prekida prebacivanjem čestica u SIF u kojem se zatim do 180. minute odvija kontinuirano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta. Sličan profil otpuštanja pokazuje i sustav P-KP, samo što za navedeni sustav otpuštanje traje 150. minuta.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Kod hidrogel čestica, dodatak prirodnih materijala (izolata proteina sirutke, kakaovog praha, rogača i zelene kave) u matriks pektinskog gela, rezultirao je formiranjem većih čestica. Također, „jačanjem“ pektinskog gela kakaovim prahom formirane su najtvrdje i najelastičnije čestice.
2. Raspodjela veličina čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem ovisila je o vrsti dodanog materijala u pektinski nosač. Dodatkom rogača formirane su najveće čestice s najnižim PSD rasponom, dok je dodatak izolata proteina sirutke rezultirao najmanjim česticama s vrlo nehomogenom raspodjelom veličine.
3. Binarni sustavi dobiveni tehnikama ionskog geliranja i sušenja raspršivanjem (osim sustava pektin-rogač) sadržavali su manji udjel vode od čestica pripremljenih s čistim pektinom.
4. Nakon liofilizacije hidrogel čestica vidljivo je povećanje omjera mase u vodenom mediju tijekom 24 h samo u čistom pektinskom sustavu, dok se kod binarnih sustava omjer povećanja mase značajno smanjio uslijed raspada čestica.
5. Čestice sustava pektin-izolati proteina sirutke dobivene sušenjem raspršivanjem pokazale su najbolju topljivost, ali i najdulje vrijeme močivosti. Svi sustavi su pokazali dobru učinkovitost otapanja od svega nekoliko minuta, osim sustava pektin-rogač (oko 20 min).
6. Svi binarni sustavi dobiveni sušenjem raspršivanjem spadaju u kategoriju visoke kohezivnosti i loše tecivosti, osim sustava pektin-rogač koji pripada kategoriji srednje kohezivnosti i dovoljne tecivosti.
7. Čestice dobivene tehnikom sušenja raspršivanjem su svjetlije u odnosu na hidrogel čestice, budući da su imale više  $L^*$  vrijednosti. Kod obje inkapsulacijske tehnike, najveća ukupna promjena boje, u odnosu na čiste pektinske čestice, zabilježena je kod sustava pektin-kakaov prah i pektin-izolati proteina sirutke.
8. Primjena dodatnih materijala u pektinski gel rezultirala je poboljšanom inkapsulacijskom učinkovitošću polifenola maslačka i većim stupnjem zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, gdje je dodatak novih materijala (kakaov prah, rogač, zelena kava) pokazao visoki inkapsulacijski potencijal (inkapsulacija polifenola - >80 %).
9. Čestice dobivene tehnikom ionskog geliranja pokazale su bolju učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta od čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem.

10. Sustavi dobiveni ionskim geliranjem pokazali su poželjan kontinuirani profil otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, no tijekom analize iz čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem otpustio se znatno veći udjel istih, što ukazuje na visoki potencijal obje inkapsulacijske tehnike za imobilizaciju biljnih polifenola.

## 6. LITERATURA

Acosta E. (2009) Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **14**: 3 – 15.

Aguilera J. M., Valle J. M., Karel M. (1995) Review: caking phenomena in food powders. *Trends in Food Science Technology* **6**: 149 – 154.

Allwyn Sundar Raj A., Rubila S., Jayabalan R., Ranganathan T. V. (2012) A Review on Pectin: Chemistry due to general properties of pectin and its pharmaceutical uses. *Open Access Scientific Reports* **1(12)**: 1 – 4.

Anonymous 1 (2017) <<http://www.biovitalis.hr/sastojci/maslacak.html>> Pristupljeno 18. lipnja 2018.

Augustin M. A., Sanguansri L., Margetts C., Young B. (2001) Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia* **53**: 220 – 223.

Awasthi R., Kulkarni G. T., Ramana M. V., Andreali Pinto T., Satiko Kikuchi I., Dal Molim Ghisleni D., Souza Braga M., De Banko P., Dua K. (2017) Dual crosslinked pectin–alginate network as sustained release hydrophilic matrix for repaglinide. *International Journal of Biological Macromolecules* **97**: 721 – 732.

Belščak-Cvitanović A., Lević S., Kalužević A., Špoljarić I., Đorđević V., Komes D., Mršić G., Nedović V. (2015) Efficiency assessment of natural biopolymers as encapsulants of green tea (*Camellia sinensis* L.) bioactive compounds by spray drying. *Food and Bioprocess Technology* **8(12)**: 1 – 17.

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 Hydrocolloids* **57**: 139 – 152.

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

Bušić A., Belščak-Cvitanović A., Wang Y., Vojvodić A., Karlović S., Špoljarić I., Mršić G., Veršec P., Vučilovski J., Komes D. (2016) Application of whey protein isolates and zein for the formulation of alginate-based delivery systems encapsulating *Ganoderma lucidum* polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **8(2)**: 99 – 106.

Bušić A., Belščak-Cvitanović A., Vojvodić-Cebin A., Karlović S., Kovač V., Špoljarić I., Mršić G., Komes D. (2018) Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Research International* **11**: 244 – 255.

Cal K., Sollohub K. (2010) Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *Journal of Pharmaceutical Science* **99(2)**: 575 – 586.

Carr R. L. (1965) Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering* **72**: 163 – 168.

Champagne C., Fustier P. (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* **18**: 184 – 190.

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. *International Journal of Molecular Science* **13(1)**: 260 – 285.

Chen L., Remondetto G. E., Subirade M. (2006) Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology* **17(5)**: 272 – 283.

Choi J. H., Shin K. M., Kim N. Y., Hong J. P., Lee Y. S., Kim H. J., Park H. J., Lee K. T. (2002) Taraxinic Acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the *Taraxacum coreanum* NAKAI, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25(11)**: 1446 – 1450.

Clare B.A., Conroy R.S., Spelman K. (2009) The diuretic effect in human subjects of an *Taraxacum officinale* folium over a single day. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* **15**: 929 – 934.

Colak N., Torun H., Gruz J., Strnad M., Hermosin-Gutierrez I., Hayirlioglu-Ayaz S., Ayaz F. A. (2016) Bog bilberry phenolics, antioxidant capacity and nutrient profile. *Food Chemistry* **201**: 339 – 349.

Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15(10)**: 7313 – 7352.

Das S., Ng K. Y., Ho P. C. (2010) Formulation and optimization of zinc-pectinate beads for the controlled delivery of resveratrol. *AAPS PharmSciTech* **11(2)**: 729 – 742.

de Moura S. C. S., Berling C. L., Germer S. P. M., Alvim I. D., Hubinger M. D. (2017) Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry* **241**: 317 – 327.

Dias M. I., Ferreira I. C. F. R., Barreiro M. F. (2015) Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food and Function* **6**: 1035 – 1052.

Donsi F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G. (2011) Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology* **44**: 1908 – 1914.

Dorsch W. (1996) Clinical application of extracts of *Echinacea purpurea* or *Echinacea pallid.* Critical evaluation of controlled clinical studies. *Zeitschrift für Ärztliche Fortbildung* **90(2)**: 117 – 122.

Đorđević V., Balanč B., Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V. (2015) Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews* **7**: 452 – 490.

Elez Garofulić I., Zorić Z., Pedisić S., Dragović-Uzelac V. (2017) Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material. *Food Science and Technology* **83**: 110 – 117.



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., ur., Nova Publishers, str. 17 - 27.

Gerez C. L., Valdez G. F., Gigante M. L., Grosso C. R. F. (2012) Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Letters in Applied Microbiology* **54(6)**: 552 – 556.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* **40**: 1107 – 1121.

González-Castejón M., Rodríguez-Casado A., Visioli F. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Nutrition Reviews* **70(9)**: 534 – 547.

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

Harris R., Lecumberri E., Mateos-Aparicio I., Mengíbar M., Heras A. (2011). Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers* **84(2)**: 803 – 806.

Hausner H. H. (1967) Friction conditions in a mass of metal powder. *International Journal of Powder Metallurgy* **3**: 7 – 13.

Hegi G. (1987) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Compositae II*, 2. izd., Paul Parey. str. 866 – 916.

Hocq L., Pelloux J., Lefebvre V. (2017) Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. *Trends in Plant Science* **22(1)**: 20 – 29.

Huang Y., Sheng J., Yang F., Hu Q. (2007) Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *Journal of Food Engineering* **78(2)**: 687 – 692.

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

Jangra S. R., Bhatt D. C. (2017) Recent trends in microencapsulation: A review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* **5(11)**: 106 – 114.

Jyothi Sri. S., Seethadevi A., Suria Prabha K., Muthuprasanna P., Pavitra P. (2012) Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **3(1)**: 509 – 531.

Kim F. S., Lee J. S., Lee H. G. (2016) Calcium-alginate microparticles for sustained release of catechin prepared via an emulsion gelation technique. *Food Science and Biotechnology* **25(5)**: 1337 – 1343.

Kuang S. S., Oliveira J. C., Crean A. M. (2010) Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **50(10)**: 951 – 968.

Kurozawa L. E., Dupas Hubinger M. (2017) Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science* **15**: 50 – 55.

Lee J. S., Kim E. J., Chung D., Guy-Lee H. (2009) Characteristics and antioxidant activity of catechin-loaded calcium pectinate gel beads prepared by internal gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **74**: 17 – 22.

Lesinger I. (1999) Ljekovitost povrća, voća i začina, Biblioteka kućna biljna ljekarnica, Volosko. str. 158 – 161.

Li Z., Jiang H., Xu C., Gu L. (2015) A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids* **43**: 153 – 164.

Lootens D., Capel F., Durand D., Nicolai T., Boulenguer P., Langendorff V. (2003) Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids* **17**: 237 – 244.

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

Löfgren C., Guillotin S., Hermansson A. M. (2006) Microstructure and kinetic rheological behavior of amidated and nonamidated LM pectin gels. *Biomacromolecules* **7(1)**: 114 – 121.

Mahfoudhi N., Ksouri R., Hamdi S. (2016) Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization, and applications in food industry. *Emulsions* **3**: 365 – 403.

Martins M. I., Barreiro M. F., Coelho M., Rodrigues A. E. (2014) Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal* **245**: 191 – 200.

Matioli G., Rodriguez-Amaya D. B., (2002) Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: estudo da estabilidade. *Brazilian Journal of Food Technology* **5**: 197 – 203.

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

McClements D.J., Decker E. A., Weiss J. (2007) Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science* **72**: 109 – 124.

Milanovic J., Manojlovic V., Levic S., Rajic N., Nedovic V., Bugarski B. (2010) Microencapsulation of flavors in carnauba wax. *Sensors (Basel)* **10(1)**: 901 – 912.

Munin A., Edwards-Lévy (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* **3(4)**: 793 – 829.

Murakami H., Yoneyama T., Nakajima K., Kobayashi M. (2001) Correlation between loose density and compactibility of granules prepared by various granulation methods. *International Journal of Pharmaceutics* **216**: 159-164.

Nazzaro F., Orlando P., Fratianni F., Coppola R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current opinion in Biotechnology* **23(2)**: 182 – 186.

Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* **1**: 1806 – 1815.

Nithitanakool S., Pithayanukul P., Bourgeois S., Fessi H., Bavovada R. (2013) The development, physicochemical characterisation and *in vitro* drug release studies of pectinate gel beads containing Thai mango seed kernel extract. *Molecules* **18(6)**: 6504 – 6520.

Oakenfull D. G. (1991) The Chemistry of High-methoxyl Pectins. U: The Chemistry and Technology of Pectin, Walter R. H., ur., Academic Press, str. 87 – 108.

Obón J. M., Castellar M. R., Alacid M., Fernández-López J.A. (2009) Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering* **90**: 471 – 479.

Oehme A., Valotis A., Krammer G., Zimmermann I., Schreier P. (2011) Preparation and characterization of shellac-coated anthocyanin pectin beads as dietary colonic delivery system. *Molecular Nutrition and Food Research* **1**: 75 – 85.

Onal S., Timur S., Okutucu B., Zihnioglu F. (2005) Inhibition of L-glucosidase by aqueous extract of some potent antidiabetic medicinal herb. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **35**: 39 – 36.

Ough C. S., Amerine M.A. (1988) Methods for Analysis of Musts and Wine, John Wiley & Sons, Inc. str. 196 – 221.

Prior L. R., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290 – 4302.

Patel N., Lalwani D., Gollmer S., Injeti E., Sari Y., Nesamony J. (2016) Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. *Prog Biomater* **5**: 117 – 133.

Patel R. P., Patel M. P. Suthar A. M. (2009) Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology* **2(10)**: 44 – 47.

Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M. (2012) A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* **4(4)**: 27 – 32.

Patil J. S., Kamalapur M. V., Marapur S. C., Kadam D. V. (2010) Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **5**: 241 – 248.

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

Porzio M. A. (2007) Flavor delivery and product development. *Food Technology* **1(7)**: 22–29.

Racoviță Ș., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie* **54**: 709 – 718.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231 – 1237.

Rodriguez-Hernández G.R., González-García R., Abud-Archila M.A., Grajales-Lagunes A., Ruiz-Cabrera M.A. (2005) Spray drying of cactus pear juice: Effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology* **23**: 955 – 973.

Şahin-Nadeem H., Torun M., Özdemir F. (2011) Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT - Food Science and Technology* **44(7)**: 1626 – 1635.

Schubert H. (1980) Processes and properties of instant powdered foods. *Food Processing Engineering* **1**: 675 – 684.

Serra Costa S., Aparecida Souza Machado B., Regina Martin Fabio Bagnara A., Ragadalli A. S., Rabello Costa Alves A. (2015) Drying by spray drying in the food industry: Microencapsulation, process parameters and main carriers used. *African Journal of Food Science* **9(9)**: 462 – 470.

Silveira A.C.P., Perrone I.P., Junior P.H.R., Carvalho A.F. (2013) Secagem por Spray: uma revisão. *Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes* **68(391)**: 51-58.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 1179.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology* **299**: 152.

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

Sobel R., Versic R., Goankar A. G. (2014) Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. U: Microencapsulation in the Food Industry, Goankar A., Vasisht N., Khare A., Sobel R., ur., Academic Press, str. 3 – 11.

Sosnik A., Seremeta K. P. (2015) Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science* **223**: 40 – 54.

Sriamornsak P., Nunthanid J. (1998) Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics* **160**: 207 – 212.

Sun-Waterhouse D., Wadhwa S.S., Waterhouse G.I.N. (2013) Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: A comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food and Bioprocess Technology* **6(9)**: 2376 – 2388.

Takasi S., Seibi P. A. (1998) Paste and gel properties of prim3 corn and wheat starches with and without nitic liquids. *Cereal Chemistry* **65**: 474 – 483.

Tello F., Falfan-Cortez R. N., Martinez-Bustos F., Martins da Silva V., Dupas Hubinger M., Grosso Carlos (2014) Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloids* **43**: 670 – 678.

Trifković K., Milašinović N., Djordjević V., Zdunić G., Kalagasidis-Krušić M., Knežević-Jugović Z., Šavikin K., Nedović V., Bugarski B. (2015) Chitosan crosslinked microparticles with encapsulated polyphenols: Water sorption and release properties. *Journal of Biomaterials Application* **30**: 618 – 631.

Vasile F. E., Judis M. A., Mazzobre M. F. (2018) Impact of *Prosopis alba* exudate gum on sorption properties and physical stability of fish oil alginate beads prepared by ionic gelation. *Food Chemistry* **250**: 75 – 82.

Vladisavljević G. T. (2012) Encapsulation Techniques. U: Encyclopedia of Membranes, Drioli, E., Giorno, L., ur., Heidelberg: Springer Reference, str. 11-13.

Zhang X., Xiong H., Liu L. (2012) Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacol* **141(1)**: 206 – 211.

Zuidam N. J., Heinrich J. (2009) Encapsulation of Aroma. U: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing, Zuidam N. J., Nedovic V. A., ur., Springer, str. 127 – 160.

Wandrey C., Bartkowiak A., Harding S. E. (2009) Materials for Encapsulation. U: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing, Zuidam N. J., Nedovic V. A., ur., Springer, str. 31 – 100.

## Izjava o izvornosti

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

Kristina Vučinec

ime i prezime studenta