

Formulacija i karakterizacija inkapsuliranih sustava liposoma s dopaminom iz kore banane

Cvetković, Jakov

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:316564>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Jakov Cvetković

7467/BT

**FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA INKAPSULIRANIH
SUSTAVA LIPOSOMA S DOPAMINOM IZ KORE BANANE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija uživala

Mentor: Prof.dr.sc. Draženka Komes

Zagreb, 2020.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina*“ (HRZZ-IP-2018-01-9717).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Formulacija i karakterizacija inkapsuliranih sustava liposoma s dopaminom iz kore banane

Jakov Cvetković, 0058211309

Sažetak: U posljednje vrijeme agro-industrijski otpad plijeni pozornost znanstvenika zbog visokih udjela bioaktivnih sastojaka, posebice polifenolnih spojeva, čija konzumacija je povezana s brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. U ovome radu, kora banane, tropskog voća iz porodice *Musaceae*, izabrana je kao sekundarni biljni materijal za ekstrakciju polifenolnih spojeva primjenom konvencionalnih (infuzija, dekokcija, maceracija) i inovativnih tehnika ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija subkritičnom vodom). U svrhu karakterizacije dobivenih ekstrakata određeni su udjeli ukupnih polifenola, udio dopamina i antioksidacijski kapacitet te je ekstrakt s najboljim bioaktivnim parametrima inkapsuliran u liposome. Formuliranim liposomima određena je inkapsulacijska učinkovitost i fizikalno-kemijski parametri (veliĉine, zeta potencijala i indeksa polidisperzije). Infuzija (80 °C, 30 min) se pokazala najuspješnijom tehnikom u ekstrakciji ukupnih polifenola (25,38 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka), ali je dekokt (100 °C, 20 min) zbog najizraženijih antioksidacijskih svojstava (0,196 i 0,164 mmol Trolox g⁻¹ s.tv. uzorka) i najvišeg udjela dopamina (12,63 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka) inkapsuliran u liposome. Inkapsulacijska učinkovitost dopamina bila je u rasponu od 35,10 do 41,12 %, a izmjerene vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara ukazuju na relativnu homogenost i stabilnost formuliranih liposoma.

Ključne riječi: ekstrakcija, inkapsulacija, kora banane, liposomi, polifenoli

Rad sadrži: 41 stranice, 10 slika, 6 tablica, 79 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Danijela Šeremet, mag. ing. techn. aliment.

Rad predan: rujan, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Formulation and characterization of liposome systems encapsulated with dopamine from banana peel

Jakov Cvetković, 0058211309

Abstract: In recent years, agro-industrial waste has been subject of many scientific research due to its high content of bioactive compounds, especially polyphenols, whose consumption is linked with various positive effects on human health. In this thesis, banana peel, part of a tropic fruit from the *Musaceae* family, has been chosen as a secondary plant material for the extraction of polyphenolic compounds using conventional (infusion, decoction, maceration) and innovative extraction methods (ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, subcritical water extraction). Obtained extracts were characterized by determining the total polyphenols content, dopamine content and antioxidant capacity, and the extract with the best bioactive parameters was further used for encapsulation in liposomes. Formulated liposomes were characterized by determining the encapsulation efficiency and physico-chemical parameters. Infusion (80 °C, 30 min) showed to be most successful technique in the extraction of total polyphenols (25,38 mg EGK g⁻¹ dmb), and decoction (100 °C, 20 min) in dopamine extraction (12,63 mg EGK g⁻¹ dmb). Extract obtained by decoction was also characterized with the highest antioxidant capacity (0,196 and 0,164 mmol Trolox g⁻¹ dmb) and was further used for encapsulation in liposomes. Encapsulation of banana peel's extract resulted in a relatively low encapsulation efficiency of dopamine (35,10 – 41,12 %). Measured values of size, zeta potential and polydispersion index indicate the relative homogeneity and uniformity of the formulated liposomes.

Keywords: extraction, encapsulation, banana peel, liposomes, polyphenols

Thesis contains: 41 pages, 10 figures, 6 tables, 79 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: Danijela Šeremet, MSc

Defence date: September, 2020.

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Agro-industrijski otpad.....	2
2.2. Polifenolni spojevi.....	3
2.3. Inovativne tehnike ekstrakcije.....	4
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	4
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	5
2.3.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom.....	7
2.4. Kora banane	8
2.4.1. Karakteristike, uzgoj i uporaba banane	8
2.4.2. Kemijski i bioaktivni sastav kore banane	9
2.5. Inkapsulacija polifenola	9
2.5.1. Inkapsulacija liposomima	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. Materijal	15
3.1.1. Uzorci	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Aparatura i pribor	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Priprema uzorka kore banane	17
3.2.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kore banane	17
3.2.2.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije	17
3.2.2.2. Inovativne tehnike ekstrakcije.....	18
3.2.3. Karakterizacija bioaktivnog sastava dobivenih ekstrakata	18
3.2.4. Inkapsulacija u liposome i određivanje inkapsulacijske učinkovitosti	21
3.2.4.1. Priprema vodenog ekstrakta kore banane za inkapsulaciju u liposome	21
3.2.4.2. Inkapsulacija polifenolnih spojeva kore banane u liposome	21
3.2.4.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija liposoma.....	21
3.2.4.4. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti	22
3.2.4.5. TBARS (engl. Thiobarbituric acid reacting substances) metoda.....	22

4. RASPRAVA I REZULTATI	23
4.1. Priprema uzoraka kore banane.....	23
4.2. Ekstrakcije polifenolnih spojeva iz kore banane – konvencionalne i inovativne tehnike ...	25
4.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija liposoma	28
4.4 Karakterizacija inkapsulacijske učinkovitost liposomnih sustava.....	30
4.5. TBARS metoda	31
5. ZAKLJUČCI	33
6. LITERATURA.....	34

1. UVOD

Polifenoli, bioaktivni spojevi biljnog podrijetla, posljednjih godina nailaze na sve veću popularnost među znanstvenicima, ali i potrošačima, upravo zbog brojnih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Brojne vrste voća pokazale su se kao odličan izvor polifenola, ali također i agro-industrijski otpad koji nastaje njihovim procesiranjem (npr. kore, ljuske, stabljike, mekinje itd.). Banana, tropsko voće iz porodice *Musaceae*, bogato je nutrijentima i bioaktivnim sastojcima, a njena kora vrijedan je izvor polifenola, kao što su flavan-3-oli, flavonoli i hidroksicimetne kiseline, ali i kateholamina, prvenstveno dopamina (Vu i sur., 2018). Kako bi se dobio što veći ekstrakcijski prinos polifenolnih spojeva, danas se istražuju brojne inovativne tehnike ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mikrovalovima, ekstrakcija subkritičnom vodom i sl. Razvoj novih procesa i metoda ekstrakcija može ne samo povećati vrijednost i značaj agro-industrijskog otpada, već i doprinijeti smanjenju cijena novoformuliranih proizvoda te smanjiti potrebu za korištenjem nepoželjnih kemikalija u formulaciji istih. Međutim, budući da su polifenoli nestabilni spojevi, a često i nepoželjnog okusa, znanstvenici u području prehrambene tehnologije razvili su brojne postupke inkapsulacije kako bi se osigurala stabilnost ovih spojeva u probavnom sustavu čovjeka, a ujedno i maskirao njihov nepoželjan okus. Liposomi su naročito zanimljivi zbog svoje kemijske strukture koja uključuje lipidni dvosloj, a budući da se sastoje od dvije faze, vodene i lipidne, prikladni su za inkapsulaciju i hidrofilnih i lipofilnih spojeva. Liposomi su prvotno bili korišteni za inkapsulaciju enzima, cjepiva i sl. u farmaceutskoj industriji, dok je njihovim primjena u području prehrambene tehnologije relativno nova disciplina.

Cilj ovog rada je ekstrahirati polifenolne spojeve iz kore banane primjenom konvencionalnih i inovativnih tehnika ekstrakcije te provesti inkapsulaciju istih u liposome. U svrhu karakterizacije dobivenih ekstrakata odredit će se udjeli ukupnih polifenolna, udio dopamina i antioksidacijski kapacitet, a ekstrakt najboljih bioaktivnih svojstava inkapsulirat će se u liposome. Formuliranim liposomima odredit će se inkapsulacijska učinkovitost i fizikalno-kemijski parametri (veličina, zeta potencijal i indeks polidisperzije).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Agro-industrijski otpad

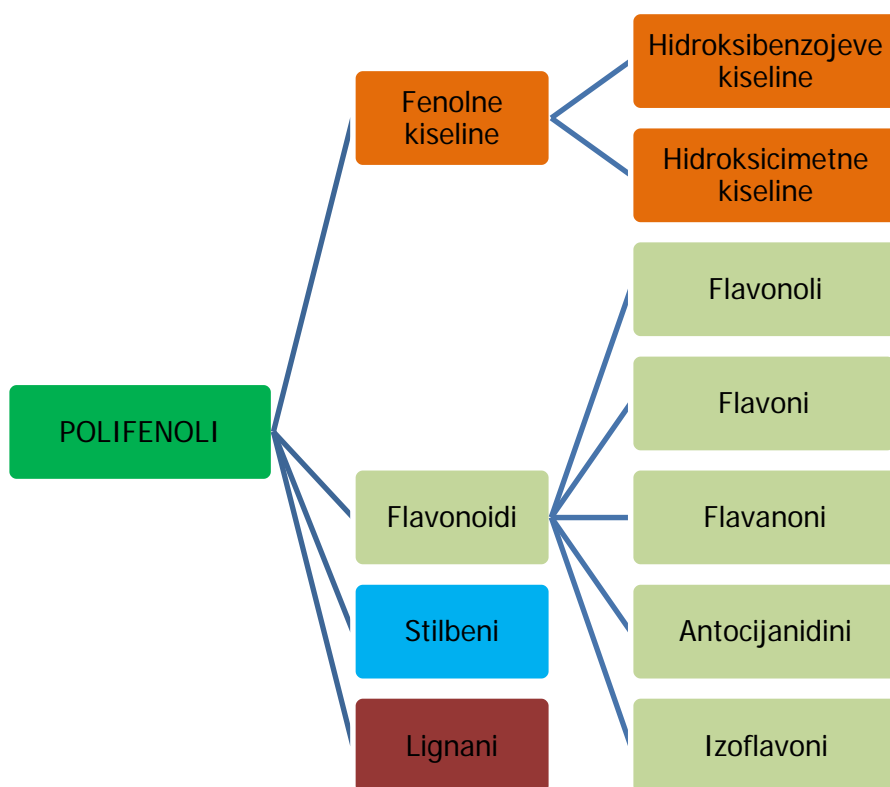
Pod pojmom agro-industrijskog otpada podrazumijevaju se ostaci i nusproizvodi uzgoja i procesiranja poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda, poput žitarica, voća, peradi, ribe, drveća itd. Ovi nusproizvodi bogati su izvor brojnih kemijskih i bioaktivnih sastojaka koji su od velike važnosti za mnoge industrije (prehrambenu, kemijsku, petrokemijsku itd.). Preradom agro-industrijskog otpada moguće je dobiti mnoštvo proizvoda, kao što su mikrobne kulture, biogorivo, bioplin, enzimi i sl. koji nalaze primjenu u raznim granama industrije. Među prednostima zbog kojih su ove sekundarne biljne sirovine izrazito zanimljive su njihova dostupnost i cijena (Komes i Šeremet, 2019). Naime, budući da se radi o otpadnim biomasama (npr. kora banane, melasa, otpadno bilje, mulj, trop grožđa itd.) koje su u industriji prisutne u velikim količinama, cijena ovih sirovina je relativno niska, što je velika prednost, kako u prehrambenoj industriji i biotehnologiji, tako i u ostalim industrijama. Prehrambena industrija stvara veliku količinu nusproizvoda bogatog bioaktivnim sastojcima, kao što su prehrambena vlakna, proteini, polisaharidi, polifenolni spojevi itd., što prije svega predstavlja neiskorišten potencijal koji se raznim inovativnim tehnikama i metodama biokonverzije može prevesti u velik broj korisnih proizvoda. Naročito zanimljivi su polifenolni spojevi koji su posljednjih godina postali predmet brojnih znanstvenih istraživanja zbog izraženog antioksidacijskog kapaciteta uz koji se vežu brojni pozitivni zdravstveni učinci. Naime, agro-industrijski otpad, koji najčešće uključuje ljuske, kore, koštice, stabljike i sl. vrlo često sadrži veći udio polifenolnih spojeva nego jestivi dijelovi. Pojačana sinteza polifenolnih spojeva u vanjskim dijelovima biljke nastaje kao rezultat obrane biljke od biljojeda ili patogena, privlačenja oprašivača ili zbog direktnog UV zračenja (Brusotti i sur., 2014). U radu Giomara i suradnika (2014) ekstrakt kore jabuke pokazao se bogatijim polifenolnim spojevima u usporedbi s ekstraktom jestivog dijela jabuke. Slične rezultate dobili su Caro i Piga (2008) karakterizacijom pulpe i ovojnice smokvi određivši puno viši udio antocijana (otprilike 188 puta više) u kori nego u pulpi smokve, u kojoj antocijani gotovo da nisu ni prisutni. Nadalje, Wijngaard i suradnici (2002) su analizom bioaktivnog sastava jabuka, kivija i grejpa odredili su veći udio ukupnih polifenola u kori i sjemenkama u usporedbi sa pulpom plodova te izravnu povezanost udjela polifenolnih spojeva s antioksidacijskim kapacitetom.

Uz navedene prednosti, uporaba agro-industrijskog otpada predstavlja i velik izazov zbog ograničenih mogućnosti korištenja. Stoga se aktivno radi na otkrivanju novih, inovativnih rješenja

koja bi proširila primjenu agro-industrijskog otpada u industriji, ali i učinila metode gospodarenja agro-industrijskim otpadom prihvatljivijima za okoliš.

2.2. Polifenolni spojevi

Polifenoli su bioaktivni spojevi, vrlo rašireni u prirodi te su prisutni u mnoštvu voća, povrća, sjemenki i cvijeća (poput grožđa, borovnica, maslina, luka i sl.) ali i u prehrambenim pripravcima (kava, čaj). Osnovna podjela polifenola uključuje: flavonoide, fenolne kiseline, stilbene i lignane. Nadalje, flavonoidi se dijele na flavone, flavonole, flavanone, antocijanidine i izoflavonole, dok se fenolne kiseline mogu podijeliti na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Podjela polifenola prema kemijskoj strukturi prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Podjela polifenola (Abbas i sur., 2016)

Polifenoli su veoma zanimljivi zbog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. Mnoga znanstvena istraživanja upućuju na iznimno visoki antioksidacijski kapacitet polifenola, odnosno na njihovu sposobnost uklanjanja slobodnih radikala. Također, postoje mnoga istraživanja koja su dokazala pozitivan učinak polifenola u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti, karcinoma, dijabetesa i pretilosti (Boots i sur., 2008; Cheng i sur., 2007). Naime, dijeta bogata namirnicama

poput voća, povrća, kakaovih proizvoda, čaja i ostalih namirnica visokog udjela polifenola pokazala se dobrim odabirom jer smanjuje rizik pojave navedenih bolesti. Primjerice, antikancerogena svojstva zelenog čaja rezultat su djelovanja flavan-3-ola, epigalokatehin galata, koji pokazuje svojstvo induciranja apoptoze i suzbijanja rasta stanica raka (Abbas i sur., 2016). Polifenoli također neizravno pomažu u borbi protiv dijabetesa tako što smanjuju sintezu glukoze u jetri, ali i smanjenjem aktivnosti enzima poput α -amilaze i α -glukozidaze, koji su uključeni u proces oslobađanja glukoze u probavnom sustavu (Abbas i sur., 2016). Što se tiče smanjivanja rizika od pojave kardiovaskularnih bolesti, još uvijek nije potpuno jasno koji polifenoli su najučinkovitiji, no, zbog izraženih antioksidacijskih svojstava pokazuju i neka ključna kardioprotektivna svojstva, kao što su snižavanje krvnog tlaka i poboljšana aktivnost endotelnih stanica krvnih žila (Abbas i sur., 2016). Još jedna velika prednost ovih bioaktivnih spojeva je sinergističko djelovanje kako između pojedinih polifenola, tako i s ostalim komponentama hrane, raznim lijekovima poput kemoterapeutika, itd.

Polifenoli su zbog brojnih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje i široke rasprostranjenosti u prirodi, od velikog interesa za znanstvenike, nutricioniste i prehrambene inženjere širom svijeta i premda su tema brojnih istraživanja, njihova popularnost kontinuirano raste, što je vjerojatno posljedica povećane konzumacije zdravih, prirodnih i vrlo dostupnih namirnica i pića bogatih polifenolima.

2.3. Inovativne tehnike ekstrakcije

Ekstrakcija je proces izdvajanja jednog ili više sastojaka od interesa iz neke sirovine ili smjese, bez utjecaja na samo svojstvo ili strukturu sastojka koji se izdvaja. Međutim, konvencionalne tehnike ekstrakcije ponekad mogu biti skupe, neproduktivne, ili pak štetne za okoliš. Zbog težnje znanstvenika i inženjera za ekološki prihvatljivijim i učinkovitijim metodama ekstrakcije, razvijene su inovativne tehnike ekstrakcije (Rostagno i sur., 2003). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija subkritičnom vodom, koje će biti opisane u ovom poglavlju, samo su neke od primjera inovativnih tehnika ekstrakcija.

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

U posljednjih nekoliko godina primjena ultrazvuka pokazala se vrlo korisnom u prehrambenoj industriji. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom temelji se na fenomenu kavitacije koja se odvija u otapalu na koje se djeluje ultrazvučnim vibracijama preko posebne sonde.

Ultrazvuk se obično primjenjuje u smjesi čvrste i tekuće/plinovite faze. Kavitacijski mjehurići se tijekom primjene ultrazvuka stvaraju i komprimiraju, a pojačani tlak i povišena temperatura dovode do puknuća mjehurića, nakon čega se stvara udarni val koji pospješuje miješanje spoja i otapala. Ovaj fenomen stvaranja, ekspanzije i implozije kavitacijskog mjehurića naziva se akustična kavitacija (Tiwari, 2015). Na ovaj način omogućuje se bolji prijenos mase iz čvrste faze u tekuću ili plinovitu fazu.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je inovativna i „zelena“ metoda ekstrakcije. Smatra se ekonomičnijom alternativom konvencionalnim metodama, što odgovara zahtjevima industrije koja teži održivom razvoju (d'Alessandro i sur., 2012). Neki primjeri ekstrakcija polifenola iz agro-industrijskog otpada pomoću ultrazvučnih valova prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Primjeri ekstrakcije polifenola potpomognute ultrazvukom iz agro-industrijskog otpada

Sirovina	Ekstrahirani spoj/frakcija	Frekvencija (kHz)	t (min)	T (°C)	Otapalo	Prinos	Referenca
Kora mandarine	Hesperidin	60	60	40	Metanol	57 mg/g	Ma i sur., 2008
Pšenične mekinje	Polifenoli	40	25	60	70%-tni etanol	3,12 mg EGK*/g	Wang i sur., 2008
Komina jabuke	Katehin	24	28	30	50%-tni etanol	33,9 mg/g	Viroi i sur., 2010

*EGK = ekvivalenti galne kiseline

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima inovativna je metoda ekstrakcije koja se temelji na zagrijavanju smjese otapala i otopljenog analita zračenjem elektromagnetskim valovima. Princip zagrijavanja smjese pomoću mikrovalova temelji se na utjecaju mikrovalova na molekule u otopini – primjenom mikrovalova dolazi do prisilne kretnje molekula, što rezultira povišenjem temperature u uzorku, odnosno vrlo brzo dolazi do grijanja otopine iznutra (Eskilsson i Björklund, 2000). Također, dolazi do pospješivanja migracije molekula analita u ekstrakcijsko otapalo. To otapalo ima sposobnost apsorpcije energije mikrovalova koju proslijedi u obliku toplinske energije.

Otapala koja se primjenjuju u ovoj metodi pokrivaju širok spektar polarnosti (od heksana do vode), a u većini slučajeva odabrano otapalo posjeduje visoku dielektričnu konstantu što mu omogućuje uspješno apsorpiranje mikrovalne energije, no, separacijski faktor (koji je ujedno i mjera uspješnosti ekstrakcije) može se modificirati korištenjem smjese više vrsta otapala (Renoe, 1994).

U posljednjih 10-tak godina pokazuje se veliki interes za korištenjem mikrovalova u procesima ekstrakcije u laboratorijima širom svijeta (Kaufmann i Christen, 2002). Ekstrakcija mikrovalovima u mnogim slučajevima pokazuje mnogo prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike ekstrakcije, kao što su ušteda vremena i otapala te niži troškovi (Pinela i sur., 2016). Pri primjeni ove tehnike bitno je obratiti pozornost na procesne parametre i čimbenike, kao što su odabir otapala, volumen otapala, temperatura i vrijeme ekstrakcije te karakteristike uređaja u kojem se nalazi uzorak (Eskilsson i Björklund, 2000). Iako primjena mikrovalova u postupcima ekstrakcije pokazuje brojne prednosti, tijekom eksperimenta se također mogu javiti određeni problemi, poput degradacije termolabilnih spojeva primjenom viših temperatura. Primjeri ekstrakcije polifenolnih spojeva potpomognutih mikrovalovima (uz korištene procesne parametre) prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Primjeri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Sirovina	Ekstrahirani spoj/frakcija	Otapalo	Temperatura (°C)	Jačina mikrovalova (W)	Referenca
Kora limuna	Polifenoli	55%-tni etanol	<60	140	Rodsamran i Sothornvit, 2019
Kora šipka	Polifenoli	50%-tni etanol	-	600	Kaderides i sur., 2019
Industrijski otpad preslice	Polifenoli	55%-tni etanol	-	170	Milutinović i sur., 2014
Kora hrasta	Polifenoli	Metanol ili etanol	78	45	Bouras i sur., 2015
Jabučna komina	Polifenoli	62%-tni etanol	70	650	Bai i sur., 2010

2.3.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Voda je jedno od najbitnijih, najraširenijih i najviše korištenih kemijskih spojeva. Osim što je neophodna za rast i razvoj gotovo svakog organizma na Zemlji, voda se koristi i u kemijskim eksperimentima, i to u svim agregatnim stanjima (vodena para, tekuća voda, led), od kojih svako ima specifična svojstva i karakteristike. No, uporaba vode nije ograničena na uporabu nižih tlakova i temperatura. Ekstrakcija subkritičnom vodom je inovativna metoda ekstrakcije kod koje se za proces ekstrakcije koristi voda temperature između 100°C (temperatura vrenja vode pri atmosferskom tlaku) i 374°C (kritična temperatura vode), uz dovoljno visok tlak da se ta voda zadrži u tekućem stanju (Shalmashi i sur., 2007). Primjenom temperatura viših od 374°C, voda prelazi u superkritični oblik te daje lošije uvjete za ekstrakciju antioksidacijskih spojeva (Turner i sur., 2006). U subkritičnim uvjetima, vodikove veze između molekula vode se lome te dielektrična konstanta vode pada; na 250°C i atmosferskom tlaku, dielektrična konstanta vode pada s uobičajenih 79 na 27, što je vrijednost slična dielektričnoj konstanti etanola pri sobnoj temperaturi i tlaku (Ramos i sur., 2002). U ovakvim uvjetima učinkovitost ekstrakcije je visoka, budući da su prijenos mase i difuzija znatno poboljšani (Aliakbarian i sur., 2012).

Neki od primjera primjene ekstrakcije subkritičnom vodom u industriji (uz korištene procesne parametre) nalaze se u Tablici 3. Pri uporabi ekstrakcije subkritičnom vodom treba uzeti u obzir procesne parametre: tlak i temperaturu. Povišenje temperature koja se koristi za ekstrakciju može povećati topljivost spojeva od interesa u subkritičnoj vodi (Shalmashi i sur., 2007). Međutim, primjena viših temperatura također može uzrokovati i degradaciju određenih termolabilnih spojeva. Ovakav je fenomen, primjerice, zabilježen u radu Shalmashi i suradnika (2007) koji su istraživali ekstrakciju kafeina subkritičnom vodom iz otpada proizvodnje čaja te su najviši prinos uočili primjenom temperature od 175°C, dok je na temperaturi od 200°C prinos bio 33% niži što može biti rezultat degradacije kafeina na višim temperaturama (Anekpankul i sur., 2007).

Tablica 3. Primjeri ekstrakcije subkritičnom vodom

Sirovina	Ekstrahirani spoj/frakcija	Temperatura (°C)	Tlak (MPa)	Referenca
Groždana komina	Polifenoli	100-140	8-15	Aliakbarian i sur., 2012
Kora krumpira	Polifenoli	100-240	6	Singh i sur., 2011
Kora luka	Kvercetin	120	5	Turner i sur., 2006
Otpad proizvodnje čaja	Kafein	175	2-4	Shalmashi i sur., 2007
Ljuska pistacija	Polifenoli	110-190	6,9	Erşan i sur., 2018

2.4. Kora banane

2.4.1. Karakteristike, uzgoj i uporaba banane

Banana, tropsko voće iz porodice *Musaceae*, jedno je od najvažnijih i najrasprostranjenijih voća u svijetu. Bere se tijekom cijele godine i iznimno je cijenjeno zbog plodova visoke nutritivne vrijednosti i okusa. Banana je drugo najuzgajanije voće u svijetu, a svjetska proizvodnja banane, koja svake godine raste, je 2018. iznosila 115 milijuna tona (FAO, 2019). Zemlja koja uzgaja najviše banane je Indija koja dominira svjetskim tržištem banane (27% svjetskog uzgoja), a među veće zemlje proizvođače banane spadaju i Kina, Filipini, Ekvador i Brazil.

Plod banane lakše se probavlja od ostalih voćnih vrsta (Mohapatra i sur., 2010) te je tako vrijeme probave banane u ljudskom tijelu (105 min) čak upola manje od vremena probave jabuke (210 min) (Sharrock i Lustray, 2000). Na svjetsku popularnost banane također utječu i tekstura samog ploda, ugodan okus te jednostavna konzumacija (Mohapatra i sur., 2010). Osim što se konzumira u neprerađenom obliku, plod banane može se i procesirati u razne proizvode poput sladoleda, sušenog voća, kruha, vina i sl. (Jackson i Badrie, 2003; Ramli i sur., 2009; Sodchit i sur., 2013). U sastavu banane posebno su zanimljivi različiti bioaktivni spojevi koji se, osim u pulpi, nalaze i u kori banane.

2.4.2. Kemijski i bioaktivni sastav kore banane

Kora banane je prvenstveno sastavljena od lignina, pektina, celuloze i spojeva niže molekulske mase (Vu i sur., 2018), no, kao i sa ostali otpad prehrambene industrije, ista je bogata i brojnim nutritivnim i bioaktivnim sastojcima. Kora banane bogat je izvor polifenolnih spojeva, posebice flavan-3-ola (galokatehina i epikatehina), ali i ostalih spojeva kao što su dopamin, hidroksicimetne kiseline i flavonoli (Vu i sur., 2018). Usporedbe radi, kora banane sadrži mnogo više galokatehina nego pulpa banane- čak 5 puta više. Visoki udio galokatehina u kori banane (158 g/100 g suhe tvari) može se povezati i sa izrazito visokim antioksidacijskim kapacitetom ekstrakta kore banane (Someya i sur., 2002). Budući da kora čini čak 35% ukupne mase ploda banane (Vu i sur., 2016), a većina kore se u industriji tretira kao otpad, noviji podaci o zanimljivom nutritivnom i bioaktivnom sastavu kore doprinijeli su postepenom iskorištavanju kore u razne svrhe. Kora banane se, primjerice, može koristiti u medicini za tretiranje raznih bolesti, u poljoprivredi kao stočna hrana, kao organsko gnojivo (Kalemelawa i sur., 2012), kao supstrat za proizvodnju brojnih kemijskih spojeva poput etanola, ksilanaze, lakaze i organskih kiselina (Karthikeyan i Sivakumar, 2010; Meena i sur., 2015; Okafor i sur., 2007; Osmia i sur., 2007) ili pak u tehnologiji obrade voda kao adsorbens u pročišćavanju vode (Annadurai i sur., 2002). Još jedna vrlo bitna mogućnost je korištenje kore banane kao sastojak hrane s dodanom vrijednošću (Pathak i sur., 2015).

Kora banane predstavlja značajan izvor prirodnih antioksidansa jer je bogata raznim bioaktivnim spojevima koji imaju mnogobrojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, zbog čega se smatra iznimno važnom sekundarnom biljnom sirovinom. Zbog svega navedenog, ali i zbog činjenice da je prilično jeftin izvor bioaktivnih sastojaka (posebice polifenola), kora banane je tema mnogih znanstvenih istraživanja, koja se dijele u 2 područja: pronalaženje novih, učinkovitijih tehnika ekstrakcije polifenola i korištenje polifenola kao funkcionalnih dodataka hrani ili farmaceutskim proizvodima (Vu i sur., 2018).

2.5. Inkapsulacija polifenola

Kao bioaktivni spojevi koji pokazuju iznimno pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, polifenoli su od velikog interesa mnogim znanstvenicima, nutricionistima, prehrambenim inženjerima itd. Međutim, učinkovitost polifenola usko je povezana s njihovom stabilnošću i zadržavanjem biološke aktivnosti (Fang i sur., 2010). Uz problem zadržavanja stabilnosti ovih spojeva, kao problem javlja se i sam okus polifenola, koji je u mnogim slučajevima nepoželjan, tako da loša senzorska svojstva

znatno smanjuju njihovu primjenu (Fang i sur., 2010). U svrhu rješavanja navedenih problema, razvijena je tehnologija inkapsulacije koja omogućuje zaštitu velikog broja kemijskih spojeva njihovom ugradnjom u zaštitnu matricu (Thies, 2005), a razvoj novih metoda inkapsulacije ima sve veću primjenu i u prehrambenoj industriji. Danas postoje mnoge metode inkapsulacije, od kojih se neke već i koriste na industrijskoj razini (Đorđević i sur., 2015). Očekuje se da će metode inkapsulacije biti izvor rješenja mnogih problema i zahtjeva prehrambene industrije u budućnosti, pa su iz tog razloga razvijene i metode koje kombiniraju dva ili više koraka inkapsulacije kako bi se dobile multiinkapsulirane forme, koje pokazuju mnogo bolja svojstva: neki od primjera ovakvih metoda su inkorporacija u liposome, koji inkapsuliraju bioaktivni materijal, ili u hidrogel čestice (kako bi se poboljšala stabilnost i produžio rok trajanja proizvoda), sušenje ciklodekstrinskih kompleksa raspršivanjem (kako bi se smanjio utjecaj visokih temperatura tijekom sušenja) (Đorđević i sur., 2015) i dr.

Svaka od metoda inkapsulacije daje drugačije proizvode, koji se razlikuju po morfološkim svojstvima, a samim time i načinu primjene. Dva glavna „oblika“, inkapsuliranih sustava su mononuklearne kapsule (jezgra obavijena ovojnicom) i agregati (mnoštvo jezgara u matrici) (Schrooyen i sur., 2001). Iako se metode inkapsulacije razlikuju u izvedbi, generalno gledajući, kod svih postoje tri glavna koraka:

1. formiranje ovojnice oko spoja/sastojka koji se inkapsulira
2. provjera nepropusnosti ovojnice
3. izbjegavanje inkapsulacije neželjenih materijala (Gibbs i sur., 1999; Mozafari i sur., 2008).

Postoji niz razloga zbog kojih se metode inkapsulacije koriste u prehrambenoj industriji:

1. zaštita inkapsuliranog spoja/sastojka od štetnih okolišnih čimbenika
2. smanjenje evaporacije ili prijenosa spoja/sastojka u okolinu
3. modifikacija svojstva spoja/sastojka koja omogućava njegovu lakšu uporabu
4. omogućavanje postupnog otpuštanja spoja/sastojka u probavnom sustavu čovjeka kroz vrijeme
5. maskiranje nepoželjnog okusa
6. odvajanje komponenata smjese koje bi međusobno stupile u kemijsku reakciju (Desai i Park, 2005).

Neke od mnogobrojnih metoda inkapsulacije su:

- Sušenje raspršivanjem
- „Spray cooling/chilling“
- Ekstruzija
- Inkapsulacija pomoću fluidizacije
- Koacervacija
- Inkapsulacija liposomima
- Kompleksiranje
- Centrifugalna separacija
- Liofilizacija
- Kokristalizacija
- Tehnologija emulzija (Augustin i Hemar, 2009.; Desai i Park, 2005; Gibbs i sur., 1999).

Kao što je već spomenuto, inkapsulacijom polifenola izbjegavaju se određeni problemi poput nestabilnosti polifenola, smanjenja biološke aktivnosti i nepoželjnog okusa koji se inkapsulacijom maskira. Sušenje raspršivanjem koristi se još od 50-ih godina prošlog stoljeća te predstavlja ekonomičnu i fleksibilnu metodu kojom se dobivaju suhi i stabilni aditivi te dodaci jelima (Desai i Park, 2005). Kao materijali za inkapsulaciju najčešće se koriste maltodekstrin, guma arabika, modificirani škrob i sl., koji se homogeniziraju s materijalom koji se inkapsulira te se takva smjesa dodaje u raspršivač i atomizira, a kapsule koje padaju iz raspršivača skupljaju se na dnu uređaja (Fang i sur., 2010). U ovakvom je procesu bitan odabir odgovarajuće temperature ulaznog plina (koji je potreban za sušenje), za koju je dokazano da ima iznimno bitan utjecaj na ukupan udio polifenola u osušenom ekstraktu (Georgetti i sur., 2008). Koacervacija je specifična metoda inkapsulacije koja uključuje korištenje koloidnih sustava, poput želatine, kao sredstva za formiranje molekularne ovojnice (Fang i sur., 2010). Od ostalih metoda inkapsulacije važno je spomenuti i kompleksiranje – postupak u kojem se kao materijali za inkapsulaciju koriste ciklodekstrini. To su skupina cikličnih oligosaharida dobiveni iz škroba, sa šest, sedam ili osam glukoznih ostataka povezanih $\alpha(1-4)$ glikozidnom vezom, strukture nalik na cilindar (Fang i sur., 2010). Budući da je vanjski dio strukture ciklodekstrina hidrofoban, a unutarnji hidrofilan, struktura ciklodekstrina je, zbog stvaranja hidrofobnih veza, vrlo povoljno sredstvo za inkapsulaciju manje polarnih molekula, poput eteričnih ulja (Bhandari i sur., 1999; Dziezak, 1998). Jedna velika prednost ove metode je poboljšavanje topljivosti inkapsuliranih kemijskih spojeva u vodi, pogotovo ako je riječ o manje topljivim fitokemikalijama što je primjerice uočeno kod inkapsulacije resveratrola (Lucas-Abellán i sur., 2007), kvercetina (Mercader-Ros i sur., 2010),

hesperitina (Tommasini i sur., 2005) i mnogih drugih spojeva. Metoda liofilizacije vrlo je raširena u prehrambenoj industriji, te podrazumijeva primjenu vrlo niskih temperatura u svrhu sušenja i dehidracije materijala i komponenata koji su osjetljivi na visoke temperature. Inkapsulacija liofilizacijom postiže se na način da se komponenta koja se inkapsulira homogenizira sa materijalom koji se koristi za inkapsulaciju te se nakon toga komponente zajedno liofiliziraju, što rezultira dobivanjem novih, nepredvidivih molekularnih oblika (Fang i sur., 2010). Osim inkapsulacije polifenola i raznih aroma, liofilizacija se može koristiti i u očuvanju bioaktivnosti određenih lijekova (Desai i Park, 2005).

Neki od primjera navedenih metoda inkapsulacije, uz polifenole koji se inkapsuliraju te materijale koji se koriste za inkapsulaciju, navedeni su u Tablici 4.

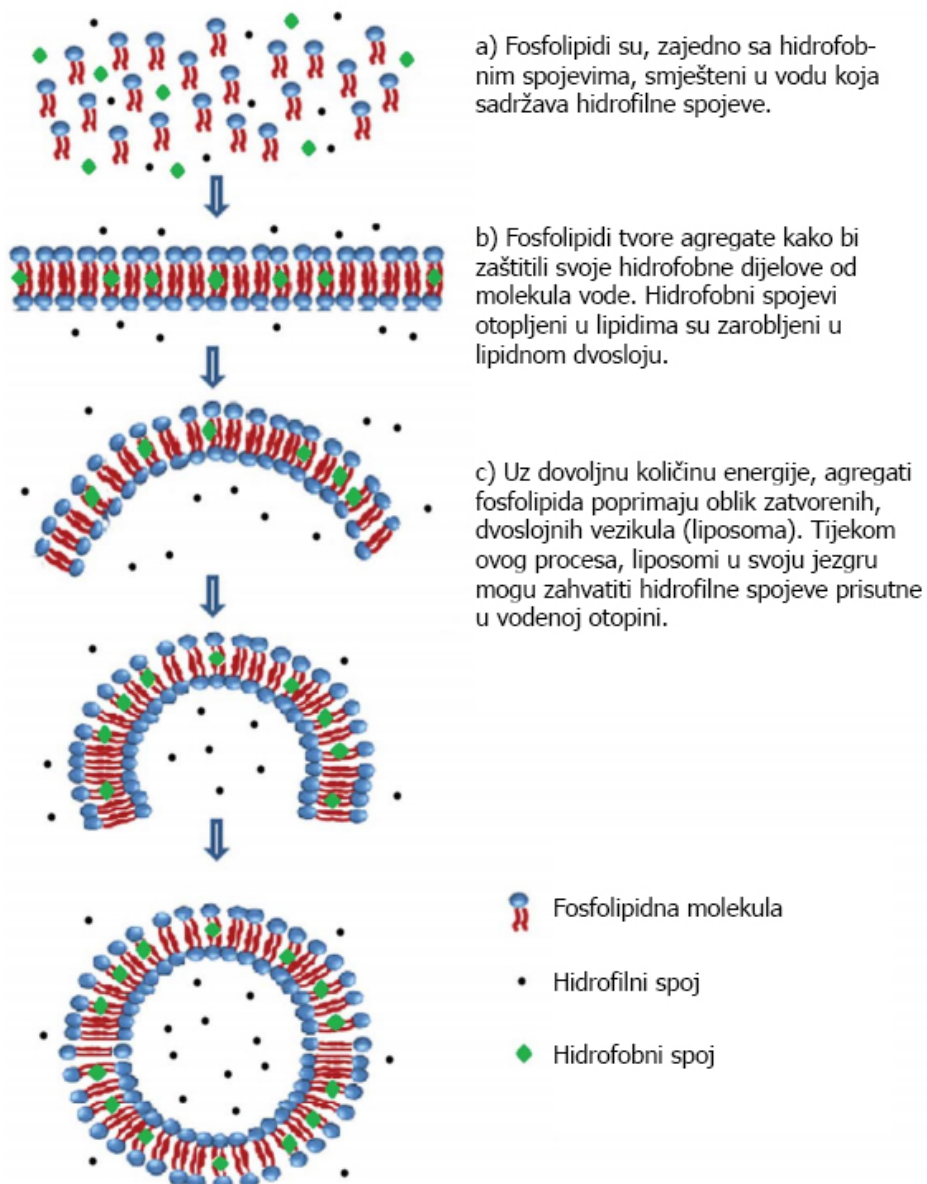
Tablica 4. Primjeri primjene različitih metoda u inkapsulaciji polifenola (Fang i sur., 2010)

Metoda	Ekstrakt/Spoj	Nosač za inkapsulaciju	Referenca
Sušenje raspršivanjem	Ekstrakt lista masline	Kitozan	Kosaraju i sur., 2006
Koacervacija	Epigalokatehin galat	Želatina	Shutava i sur., 2009
Inkapsulacija liposomima	Kurkumin	Liposomi	Takahashi i sur., 2009
Liofilizacija	Antocijanin	Maltodekstrin	Delgado-Vargas i sur., 2000
Kompleksiranje	Resveratrol	β -ciklodekstrin	Lucas-Abellàn i sur., 2007

2.5.1. Inkapsulacija liposomima

Liposomi su prvi put opisani 1965. godine na Sveučilištu Cambridge u Ujedinjenom Kraljevstvu, a opisali su ih Bangham i suradnici. Liposomi su molekule sferičnog oblika koje se sastoje od lipidnog dvosloja, a budući da se sastoje od dvije faze, vodene i lipidne, prikladni su za inkapsulaciju i hidrofilnih i lipofilnih spojeva (Fang i sur., 2010). Zbog njihove netoksičnosti, biokompatibilnosti i biorazgradivosti, koriste se kao „nosači“ za velik broj molekula, poput antimikrobnih spojeva, bojila i antioksidansa (Gibis i sur., 2011), ali i vitamina, enzima i hormona.

U vodenom mediju, fosfolipidi stvaraju agregate kako bi zaštitili svoje hidrofobne dijelove od utjecaja vode, no, istovremeno zadržavaju kontakt s vodom pomoću svojih hidrofilnih dijelova (Emami i sur., 2016). Zbog orijentacije polarnih lipida u vodi, liposomi mogu zarobiti i hidrofilne molekule otopljene u vodi, ali i lipofilne molekule otopljene u lipidima (Taylor i sur., 2005; Mozafari i sur., 2008; Thompson, 2005). Shematski prikaz formacije liposoma nalazi se na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz formacije liposoma (Emami i sur., 2016)

Velika prednost uporabe liposoma u postupku inkapsulacije je njihova mogućnost kontroliranog otpuštanja inkapsuliranog materijala u točno određenom trenutku u probavnom

sustavu čovjeka (Schäfer i sur., 1992). Bioaktivni spojevi inkapsulirani u liposome zaštićeni su od djelovanja želučanih probavnih enzima te pokazuju vrlo visoku razinu apsorpcije u ljudskom probavnom sustavu, što je vrlo velika prednost za biološku aktivnost spojeva (Takahashi i sur., 2007). Također, spojevi inkapsulirani u liposome zaštićeni su od raznih štetnih okolišnih čimbenika, kao što su štetan utjecaj svjetlosti, kisika, ekstremne pH vrijednosti i visoke temperature (Taylor i sur., 2007).

Iznimno visoka razina biološke aktivnosti spojeva inkapsuliranih u liposome određena je u brojnim znanstvenim radovima. Takahashi i suradnici (2009) odredili su porast bioaktivnosti kurkumina inkapsuliranog u liposome u odnosu na slobodni kurkumin, koji zbog niske topljivosti u vodi i osjetljivosti na želučane sokove pokazuje jako nisku razinu apsorpcije u probavnom sustavu čovjeka (Fang i sur., 2010). Priprem i suradnici (2008) objavili su povećanu razinu apsorpcije kvercetina inkapsuliranog u liposomima, u odnosu na slobodni kvercetin. Rezultati su pokazali da konzumiranje kvercetina inkapsuliranog liposomima može smanjiti dozu kvercetina koja se konzumira (zbog poboljšane apsorpcije) i pritom smanjiti potencijalnu toksičnost tog spoja. Kontinuirani razvoj novih metoda inkapsulacije doveo je i do uvođenja metode ko-inkapsulacije, odnosno istovremene inkapsulacije dviju ili više komponenti. U istraživanju koje su proveli Coradini i suradnici (2014), resveratrol i kurkumin (prirodni antioksidansi vrlo zastupljeni u ljudskoj prehrani koji se koriste za prevenciju raznih bolesti) ko-inkapsulirani su pomoću lipidnih kapsula, koje su nakon inkapsulacije u svojoj strukturi sadržavale oba spoja, no, karakteristike spojeva su zadržane. Strategija ko-inkapsuliranja resveratrola i kurkumina pritom se pokazala kao obećavajući pristup u razvoju učinkovitih lijekova i prevenciji bolesti povezanih sa oksidacijskim stresom (Coradini i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

Banana (Ekvador, Constanza Organic Bananas) je kupljena u lokalnoj trgovini te je korištena je kao biljni materijal za ekstrakciju polifenolnih spojeva. Stupanj zrelosti banana iznosio je 6 (potpuno žute), a određen je prema standardnom dijagramu boja (Tapre i Jain, 2012).

3.1.2. Kemikalije

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

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20% otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS/DPPH metodom

- Metanol, Panreac (Barcelona, Španjolska)
- 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- 1 mM otopina 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiseline (Trolox), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- 96%-tni etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- 140 mM otopina kalijevog persulfata, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- 7 mM otopina 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

HPLC analiza

- Metanol, Panreac (Barcelona, Španjolska)
- Acetonitril, Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Mravlja kiselina, Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)
- HPLC standard dopamina, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)

Inkapsulacija liposomima

- Phospholipon 90G, Lipoid Gmb (Ludwigshafen, Njemačka)
- 96%-tni etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kloroform, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Pancreac (Barcelona, Španjolska)

TBARS metoda

- Tiobarbiturna kiselina, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Trikloroetena kiselina, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)

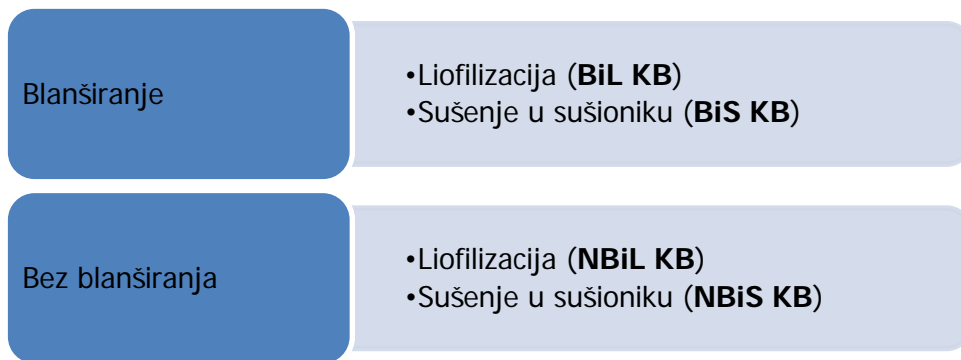
3.1.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (New Classic MF, Mettler Toledo)
- Erlenmeyer tikvica
- Whatman® filter papers 4
- Staklene epruvete
- Staklene pipete i propipete
- Mikropipete (Gibson, SAD)
- Falcon epruvete
- Termometar
- Vodena kupelj
- UV-Vis spektrofotometar (Genesys 10S, Thermo Scientific)
- Centrifuga (SL8 / 8R, Thermo Scientific)
- Magnetska miješalica (WiseStir SMHS-6, Witeg)
- Mikrofilteri (Nylon Membranes, Supelco, USA)
- Liofilizator (Christ, Alpha 1-2 LD plus, Njemačka)
- Rotavapor (Buchi Rotavapor R124, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic 2 120, Njemačka)
- Peristaltička pumpa, Perfusor compact Plus, B.Braun (Hessen, Njemačka)
- Uređaj za obradu hrane pulsirajućim UV svjetlom, Polytec (Waldbronn, Njemačka)
- Micro SYNTH platform (Milestone, Italija)
- Agilent Series 1200 kromatografski sustav, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
- Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern, UK)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzorka kore banane

Uzorak kore banane primljen je na 4 različita načina, sa i bez blanširanja (100°C, 7 min), uz sušenje u sušioniku (30 min, 50 °C) i liofilizaciju (~-47°C, 24 h). Blanširanje je provedeno s ciljem inaktivacije enzima polifenol oksidaze te utvrđivanja njegovog utjecaja na stabilnost polifenolnih spojeva u kori banane, dok je liofilizacija provedena u cilju sprječavanja oksidacije polifenolnih spojeva u prisustvu kisika i visokih temperatura. Na Slici 3 prikazani su provedeni postupci pripreme uzorka kore banane uz pripadajuće skraćenice.



Slika 3. Prikaz provedenih postupaka pripreme kore banane

Nakon provedenih postupaka pripreme, uzorci su usitnjeni i prosijani te se za sve daljnje analize koristila frakcija veličine čestica <450 µm. U svrhu utvrđivanja koja metoda pripreme je najefikasnija, provela se infuzija – postupak ekstrakcije opisan u poglavlju 3.2.2.1.

3.2.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kore banane

3.2.2.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

Postupci maceracije, infuzije i dekokcije spadaju u konvencionalne tehnike ekstrakcije.

Sve konvencionalne tehnike ekstrakcije provedene su koristeći destiliranu vodu kao otapalo, s jednakim omjerom uzorak/otapalo (1:20, w/v). Maceracija je tehnika ekstrakcije koji se odvija na sobnoj temperaturi tijekom 48 h. Infuzija podrazumijeva tretiranje uzorka otapalom visoke temperature (80°C) tijekom 30 min, a u postupku dekokcije uzorak se tretira sa otapalom još više temperature (100°C) tijekom 20 min. Nakon svake ekstrakcije uslijedili su postupci centrifugiranja (9500 rpm, 20 min) i filtracije. Ekstrakti su skladišteni na +4 °C do daljnje upotrebe.

3.2.2.2. Inovativne tehnike ekstrakcije

Sve inovativne tehnike ekstrakcije provedene su koristeći destiliranu vodu kao otapalo, s jednakim omjerom uzorak/otapalo (1:20, w/v). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je u ultrazvučnoj kupelji nominalne snage od 200 W i frekvencije od 37 kHz tijekom 30 (U30) i 60 (U60) min. Ekstrakcija subkritičnom vodom (ESV) provedena je na temperaturi od 150°C tijekom 5 min pri tlaku od 30 bar. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (EPM) provedena je u uređaju Micro SYNTH platform na temperaturi od 50 °C tijekom 5 min. Nakon svake ekstrakcije uslijedili su postupci centrifugiranja (9500 rpm, 20 min) i filtracije. Ekstrakti su skladišteni na +4°C do daljnje uporabe.

3.2.3. Karakterizacija bioaktivnog sastava dobivenih ekstrakata

Određivanje udjela ukupnih polifenola

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) s polifenolnim spojevima pri čemu nastaje plavo obojenje čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski, a direktno je proporcionalna udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 h na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 µL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}), određuje se udio ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku prema formuli:

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad [1]$$

gdje su:

x – udio ukupnih polifenola (mg L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Određivanje udjela ukupnih polifenola provodi se u dvije paralele, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK) po g suhe tvari uzorka (mg GAE g⁻¹ suhe tvari uzorka).

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

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

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. Apsorbancija te otopine na 515 nm mora biti $1,00 \pm 0,02$. U epruvetu se otpipetira 100 μ L uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 min po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbcija pri 515 nm. U slijepu se probu umjesto uzorka dodaje isti volumen metanola. Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbcije o koncentraciji standarda (mmol L⁻¹), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku prema formuli:

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [2]$$

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L⁻¹)

y – izmjerene vrijednosti apsorbcije pri 515 nm.

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provodi se u dvije paralele. Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a po g suhe tvari uzorka (mmol Trolox g⁻¹ suhe tvari uzorka).

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom 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 određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS⁺ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne

koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 μL (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata 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 do konačne koncentracije ABTS^+ radikala od 1%, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$ (1 mL otopine ABTS^+ radikala se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake etanolom).

Volumen od 20 μL uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS^+ radikala u epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 min. Prije mjerenja apsorbancije uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka u otopinu reagensa doda isti volumen etanola. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku prema formuli:

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [3]$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka ($\text{mmol Trolox L}^{-1}$)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provodi se u dvije paralele. Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\text{mmol Troloxa po g suhe tvari uzorka}$ ($\text{mmol Trolox g}^{-1}$ suhe tvari uzorka).

Određivanje udjela dopamina HPLC-DAD metodologijom

HPLC analiza provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 koristeći kromatografsku kolonu Zorbax Extend C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μm i.d.) te detektor s nizom dioda. Elucija je provedena gradijentno koristeći tri-komponentnu mobilnu fazu koja se sastojala od (A) 100% acetonitrila, (B) 2% (v/v) otopine mravlje kiseline u metanolu i (C) 2% (v/v) otopine mravlje kiseline u vodi, koristeći režim: 0 min – 0% A, 3% B, 97% C; 5 min – 0% A, 3% B, 97% C; 10. min – 0% A, 5% B, 95% C; 30 min – 30% A, 30% B, 40% C; 35 min – 30% A, 30% B, 40% C; 45 min – 0% A, 3% B, 97% C; 60 min – 0% A, 3% B, 97% C. Protok je iznosio 1 mL

min⁻¹, volumen injektiranja 20 µL i temperatura kolone 25°C. Kromatogrami su snimljeni na 280 nm. Identifikacija dopamina provedena je uspoređujući retencijsko vrijeme i apsorpcijski spektar (190 – 400 nm) s komercijalno dostupnim HPLC standardom dopamina, dok je kvantifikacija izvršena pomoću jednadžbe baždarne krivulje (25 - 300 µg mL⁻¹). Sve analize provedene su u dvije paralele. Prije analize, uzorci su filtrirani kroz 0,45 µm membranski filter.

3.2.4. Inkapsulacija u liposome i određivanje inkapsulacijske učinkovitosti

3.2.4.1. Priprema vodenog ekstrakta kore banane za inkapsulaciju u liposome

Vodeni ekstrakt kore banane koji je okarakteriziran najbogatijim bioaktivnim sastavom, uključujući udio ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet te udio dopamina, korišten je dalje za inkapsulaciju u liposome. Ekstrakt se uparava pod vakuumom u rotavaporu u svrhu koncentriranja nakon čega se kvantitativno prebacuje u Petrijeve zdjelice koje se prekriju sa parafilmom na kojem se probuše male rupe. Uzorak u Petrijevim zdjelicama stavlja se na liofilizaciju (~-47 °C, 24 h) kako bi se uklonila voda te dobio koncentrirani ekstrakt u praškastom obliku koji se nakon toga dodatno usitni.

3.2.4.2. Inkapsulacija polifenolnih spojeva kore banane u liposome

Odvaže se 1,00 g fosfolipida i kvantitativno prebaci u Erlenmeyer-ovu tikvicu volumena 50 mL i otopi u 1250 µL 96%-tnog etanola. Kod ovog načina inkapsulacije uvijek se dodaje ista masa fosfolipida i etanola. Otapanje se pospješuje stavljanjem otopine u vodenu kupelj (60°C, 1 min). Nakon toga se u tikvicu doda liofilizirani ekstrakt prethodno resuspendiran u 2 mL mikrofiltrirane destilirane vode. Inkapsulacija je provedena s 3 različite mase liofiliziranog ekstrakta (50, 100 i 200 mg) i 1g fosfolipida što je rezultiralo omjerima 1:20, 1:10 i 1:5. Ukupni volumen liposomalne suspenzije je iznosio 50 mL te se ostatak vode od 48 mL postepeno dodavao pomoću peristaltičke pumpe kroz iglu otvora 20G. Protok vode je na početku iznosio 15 mL h⁻¹, a nakon 60 min povećao se na 40 mL h⁻¹.

3.2.4.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija liposoma

Liposomi su fizikalno-kemijski okarakterizirani određivanjem veličine, zeta potencijala i indeksa polidisperzije na uređaju Malvern Nano-ZS Zetasizer. Prije analize, liposomi su razrijeđeni s destiliranom vodom 200x.

3.2.4.4. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti

1 mL suspenzije liposoma otpipetira se u plastičnu epruvetu te centrifugira (45 min, 9500 rpm). Nakon centrifugiranja, supernatant se odvoji i analizira, a preostali liposomi se ispiru s 1 mL deionizirane vode i ponovno centrifugiraju (30 min, 9500 rpm). Odvojeni supernatant se odbacuje, a zaostali talog se resuspendira u 1 mL destilirane vode i kvantitativno prebaci u staklenu epruvetu koja sadrži smjesu metanola i kloroforma (1,5 mL:1 mL). Pripremljena smjesa se snažno vorteksira 1 min nakon čega se počeka da se vodeno-metanolna faza (gornja faza) i organska faza koju čini kloroform odvoje. Odvajanje faza ubrza se stavljanjem epruveta na kratko vrijeme na centrifugiranje. Nakon odvajanja faza, gornja vodeno-metalno faza, koja sadrži polifenolne spojeve koji su bili inkapsulirani u liposome, izuzima se za analizu. Inkapsulacijska učinkovitost određuje se određivanjem udjela ukupnih polifenola (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.3.), antioksidacijskog kapaciteta (prema metodama opisanim u poglavlju 3.2.3.) te udjela dopamina (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.3.) u odvojenom supernatantu i izuzetaj vodenoj-metanolnoj fazi prema formuli:

$$\text{inkapsulacijska učinkovitost} = \frac{C_{\text{razbijeni liposomi}}}{C_{\text{razbijeni liposomi}} + C_{\text{supernatant}}} \times 100 \quad [4]$$

gdje C predstavlja udio polifenolnih spojeva i dopamina te antioksidacijske kapacitete određene u razbijenim liposomima i izuzetom supernatantu.

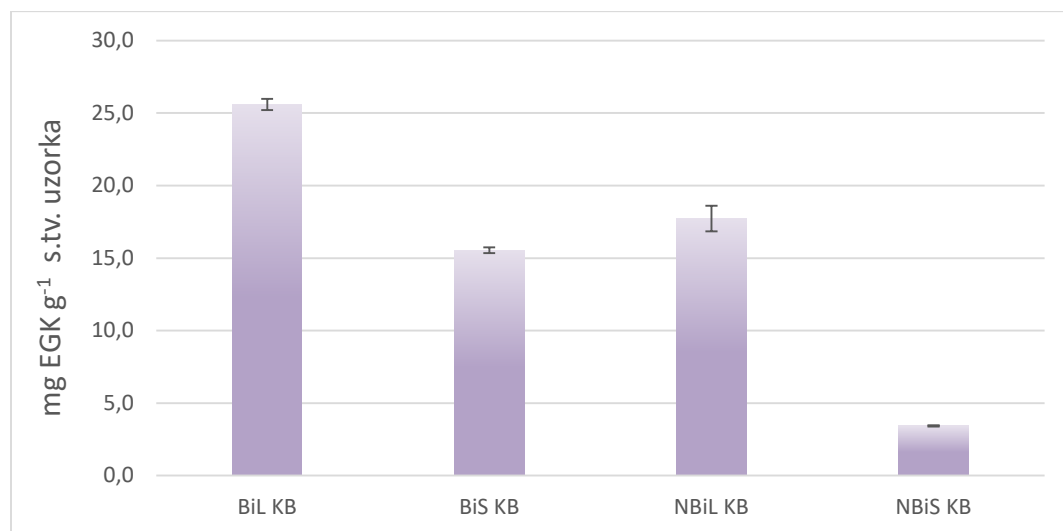
3.2.4.5. TBARS (engl. Thiobarbituric acid reacting substances) metoda

Peroksidacija pripremljenih liposoma s ekstraktom kore banane i „praznih“ liposoma određena je spektrofotometrijski TBARS metodom. Peroksidacija lipida inducirala se UV zračenjem, pomoću uređaja koji generira kratkotrajne pulseve UV zračenja na uzorak (energija zračenja po puls: 1,27 J cm⁻²). Alikvoti za analizu izuzeti su nakon 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110 i 130 broja UV pulseva. Kod TBARS metode, 0,2 mL suspenzije liposoma pomiješa se s 3 mL 20%-tne (w/v) trikloroetene kiseline u staklenoj epruveti. U istu epruvetu doda se 1 mL otopine koji sadrži jednaki omjer 2%-tne (w/v) tiobarbiturne kiseline i 20%-tne (v/v) perklorne kiseline. Sadržaj u staklenoj epruveti zagrijava se u vodenoj kupelji (100°C, 25 min). Reakcija se zaustavlja stavljanjem epruveta u hladnu vodu na 5 min, nakon čega slijedi centrifugiranje (10 min, 9500 rpm) kako bi se uklonio dobiveni talog liposoma istaložen s trikloroetenom kiselinom, a mjeri se apsorbancija supernatanta pri 532 nm.

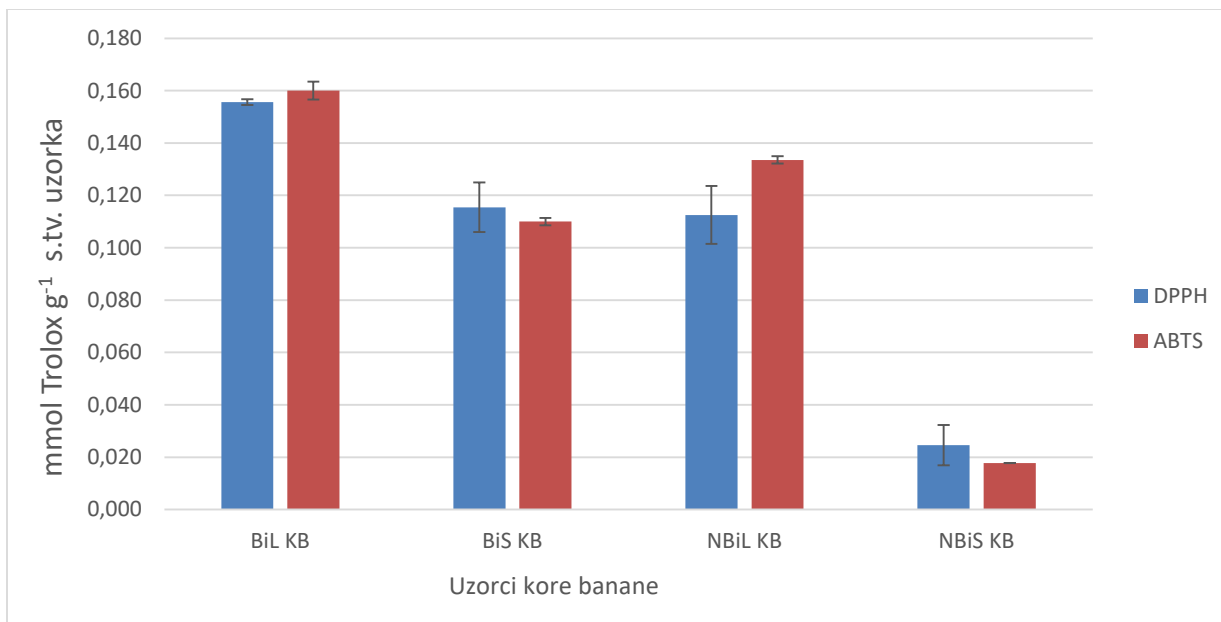
4. RASPRAVA I REZULTATI

4.1. Priprema uzoraka kore banane

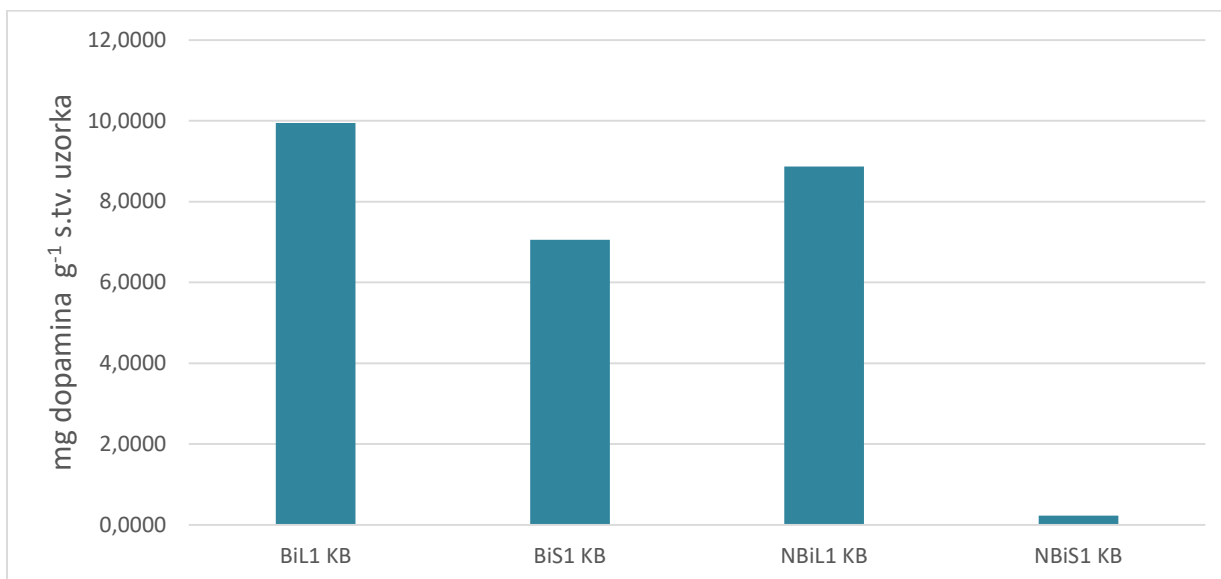
U svrhu maksimalnog očuvanja polifenolnih spojeva, uzorak kore banane pripremljen je na 4 različita načina kombinirajući sušenje liofilizacijom ili sušenje u sušioniku, sa i bez blanširanja. Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta te udjela dopamina u tim uzorcima prikazani su na Slikama 4-6.



Slika 4. Udio ukupnih polifenola u infuzijama kore banane (BiL KB = blanširana i liofilizirana kora banane; BiS KB = blanširana kora banane sušena u sušioniku; NBiL KB = neblanširana i liofilizirana kora banane; NBiS KB = neblanširana kora banane sušena u sušioniku)



Slika 5. Antioksidacijski kapacitet (izmjereno pomoću DPPH i ABTS metode) u infuzijama kore banane (BiL KB = blanširana i liofilizirana kora banane; BiS KB = blanširana kora banane sušena u sušioniku; NBiL KB = neblanširana i liofilizirana kora banane; NBiS KB = neblanširana kora banane sušena u sušioniku)

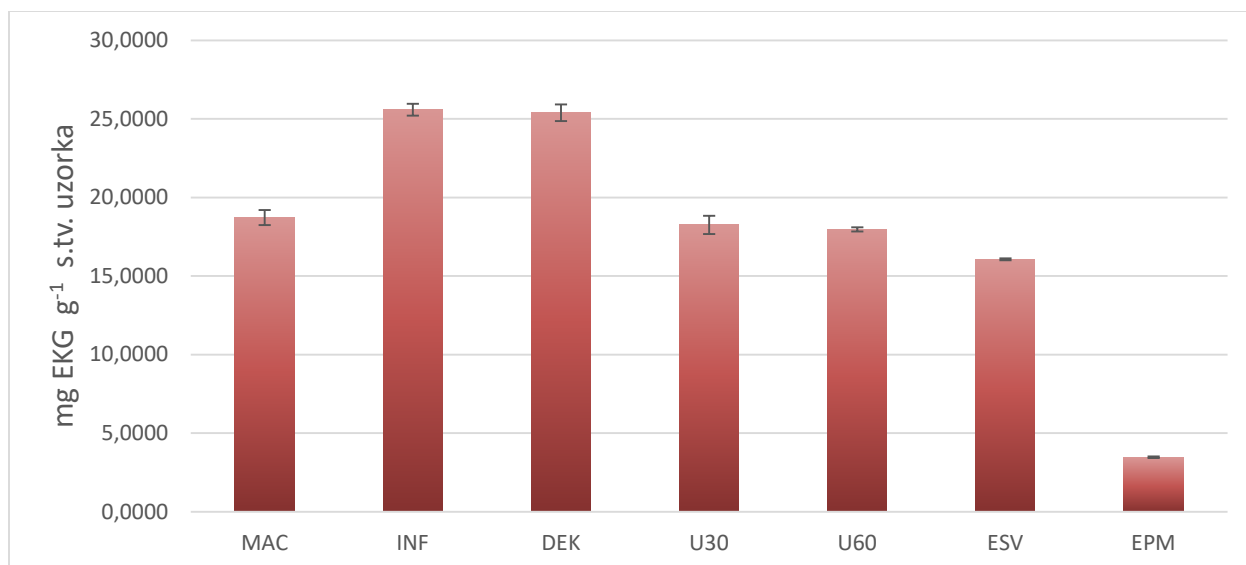


Slika 6. Udio dopamina u infuzijama kore banane (BiL KB = blanširana i liofilizirana kora banane; BiS KB = blanširana kora banane sušena u sušioniku; NBiL KB = neblanširana i liofilizirana kora banane; NBiS KB = neblanširana kora banane sušena u sušioniku)

Najveći udio ukupnih polifenola ($25,59 \pm 0,38$ mg EGK g^{-1} s.tv. uzorka), antioksidacijski kapacitet (DPPH: $0,1557$ mmola Trolox g^{-1} s.tv. uzorka; ABTS: $0,160$ mmola Trolox g^{-1} s.tv. uzorka) te udio dopamina ($9,94$ mg g^{-1} s.tv. uzorka) određen je u uzorku kore banane pripremljenom kombinacijom blanširanja i liofilizacije, dok su najmanje vrijednosti istih parametara određene u uzorku pripremljenom bez blanširanja i sušenom u sušioniku (TPC: $3,43 \pm 0,04$ mg EGK g^{-1} s.tv. uzorka; DPPH $0,0246$ mmola Trolox g^{-1} s.tv. uzorka; ABTS: $0,0178$ mmola Trolox g^{-1} s.tv. uzorka; $0,23$ g dopamin g^{-1} s.tv. uzorka). Rezultati upućuju da je postupak blanširanja bio dostatan za inaktivaciju enzima polifenol oksidaze, dok se sušenje liofilizacijom pokazalo boljom opcijom od sušenja u sušioniku za očuvanje polifenolnih spojeva kore banane. Slične rezultate dobili su Hsu i suradnici (2003) koji su pri testiranju raznih metoda sušenja brašna jama i njegovog utjecaja na kemijska i fizikalna svojstva te antioksidacijski kapacitet, potvrdili liofilizaciju kao najbolji odabir.

4.2. Ekstrakcije polifenolnih spojeva iz kore banane – konvencionalne i inovativne tehnike

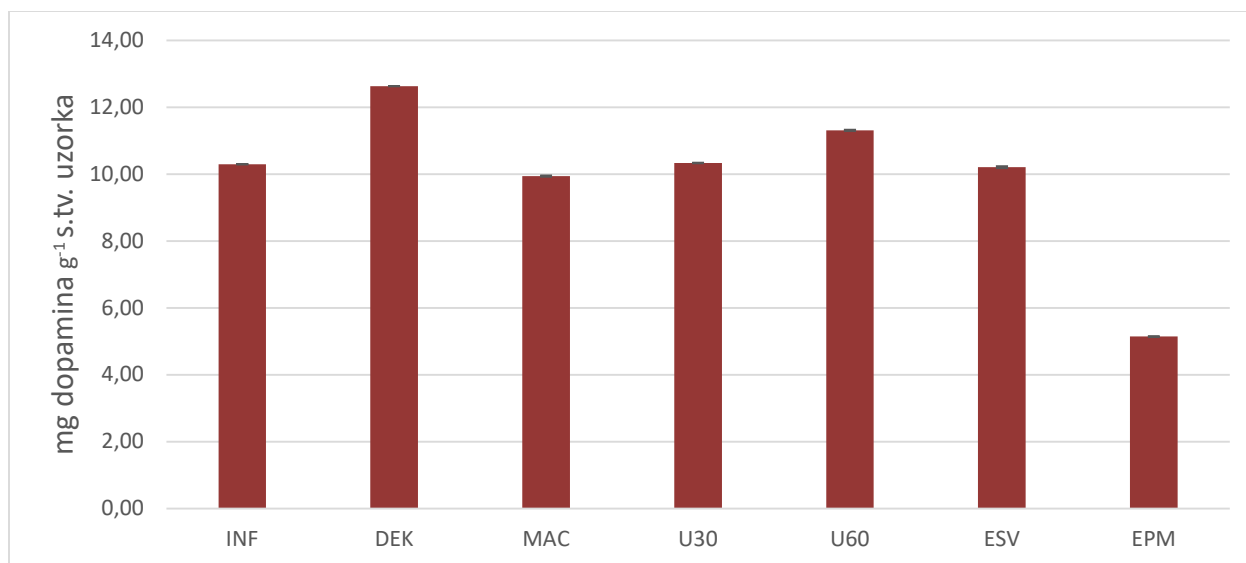
Uzorak kore banane pripremljen kombinacijom blanširanja i liofilizacije dalje je korišten za istraživanje ekstrakcijske učinkovitosti različitih konvencionalnih (infuzija, dekokcija i maceracija) i inovativnih (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ekstrakcija subkritičnom vodom) tehnika ekstrakcija. Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta te udjela dopamina u različito pripremljenim ekstraktima kore banane prikazani su na Slikama 7-9.



Slika 7. Udio ukupnih polifenola u različito pripremljenim ekstraktima kore banane (MAC – maceracija, INF – infuzija, DEK – dekokcija, U30 – ultrazvučna kupelj, 30 min, U60 – ultrazvučna kupelj, 60 min, ESV – ekstrakcija subkritičnom vodom, EPM – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)



Slika 8. Antioksidacijski kapacitet različito pripremljenih ekstrakata kore banane (MAC – maceracija, INF – infuzija, DEK – dekokcija, U30 – ultrazvučna kupelj, 30 min, U60 – ultrazvučna kupelj, 60 min, ESV – ekstrakcija subkritičnom vodom, EPM – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)



Slika 9. Udio dopamina u različito pripremljenim ekstraktima kore banane (MAC – maceracija, INF – infuzija, DEK – dekokcija, U30 – ultrazvučna kupelj, 30 min, U60 – ultrazvučna kupelj, 60 min, ESV – ekstrakcija subkritičnom vodom, EPM – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)

Iz rezultata je vidljivo da su konvencionalne tehnike ekstrakcije bile uspješnije u pogledu ekstrakcijske učinkovitosti u odnosu na inovativne. Najviši udio ukupnih polifenola ($25,59 \pm 0,38$ mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka) određen je u infuziji, najviši antioksidacijski kapacitet (DPPH metoda: $0,1637$ mmol Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka; ABTS metoda: $0,1957$ mmol Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka), kao i najviši udio dopamina ($12,63$ mg g⁻¹ s.tv. uzorka) karakteriziraju dekokt.. Najmanje vrijednosti istih parametra određene su u uzorku pripremljenom ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (udio ukupnih polifenola: $3,46 \pm 0,05$ mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka; DPPH: $0,0205$ mmol Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka; ABTS: $0,0201$ mmol Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka; dopamin: $5,14 \pm 0,01$ mg g⁻¹ s.tv. uzorka). Iz rezultata je također vidljivo da su vrijednosti udjela ukupnih polifenola određenih u ekstraktima MAC ($18,73$ mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka) i U30 ($18,26$ mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka) slične, a razlika u trajanju tehnika ekstrakcije je izrazito velika (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom traje 30 min, a maceracija 48 h). Prema Vu i suradnicima (2017), optimalni parametri za ekstrakciju polifenola potpomognutu ultrazvukom iz kore banane *Musa Cavendish*, uz 60%-tnu vodenu otopinu acetona kao otapalo, su temperatura otapala od 30 °C, tijekom 5 min i jačina ultrazvuka od 150 W. Pri ovim uvjetima, autori (Vu i sur., 2017) su dobili ekstrakt kore banane s udjelom ukupnih polifenola od $23,49$ mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka i antioksidacijskim kapacitetom od $47,09$ mg Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka (DPPH metoda), odnosno $48,38$ mg Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka

(ABTS metoda), što se poklapa s rezultatima ovog rada. Aboul-Enein i suradnici (2016) u 80%-tnom metanolnom ekstraktu kore banane odredili su vrijednosti udjela ukupnih polifenola od 17,89 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka, dok su Fatemeh i suradnici (2012) odredili 5,85, odnosno 6,85 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka za zrelu, odnosno zelenu koru *Cavendish* banane, te 0,91, odnosno 1,6 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka za zrelu, odnosno zelenu koru *Dream* banane (također u 80%-tnom metalnom ekstraktu).

Loši rezultati glede ekstrakcijske učinkovitosti mikrovalne tehnike u ovome radu ne poklapaju se sa rezultatima znanstvenih radova u kojima je određen visoki udio bioaktivnih spojeva u ekstraktima pripremljenima istom metodom (Pan i sur., 2008; Singh i sur., 2011; Jha i sur., 2017; Kaderides i sur., 2019). Kaderides i suradnici (2019) odredili su znatno višu ekstrakcijsku učinkovitost mikrovalova tijekom ekstrakcije polifenola i punikalagina iz kore običnog mogranja (199,4 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka), kao i nastanak pukotina i nabora na materijalu, što je rezultat naglog povišenja temperature uslijed djelovanja mikrovalnog zračenja (Dahmoune i sur., 2015). Nastala stanična oštećenja su poželjna kod ekstrakcija budući da olakšavaju prodor otapala u samu stanicu uzorka, što rezultira povišenjem ekstrakcijske učinkovitosti (Alara i sur., 2018). Što se tiče ekstrakcije subkritičnom vodom, ona je pokazala umjerenu ekstrakcijsku učinkovitost. Izmjereni udio ukupnih polifenola iznosio je 16,06 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka, a antioksidacijski kapacitet 0,1098 mmol Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka (DPPH metoda) te 0,097 mmol Trolox-a g⁻¹ s.tv. uzorka (ABTS metoda) i 10,29 mg dopamina g⁻¹ s.tv. uzorka. Ishak i suradnici (2019) proučavali su ekstrakciju polifenola iz kore banana *Pisang Tanduk* i *Pisang Cavendish* subkritičnom vodom pri čemu su odredili najviši udio polifenola od 69,51 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka za *Pisang Tanduk* (90 min) i 151,4 mg EGK g⁻¹ s.tv. uzorka za *Pisang Cavendish* (120 min) dobivenih pri temperaturi od 200 °C i tlaku od 100 bara. U navedenom radu (Ishak i sur., 2019) korišten je manje zreo plod banane (zelenija boja), a kako su Fatemeh i suradnici (2012) uočili da se ukupni udio polifenola smanjuje dozrijevanjem ploda, ta činjenica može objasniti nešto nižu vrijednost udjela ukupnih polifenola u ovom radu.

4.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija liposoma

Ekstrakt dobiven dekokcijom, zbog najboljih određenih bioaktivnih parametara, odabran je dalje za inkapsulaciju u liposome. Liposomi su pripremljeni na 3 različita načina mijenjajući omjer mase fosfolipida i liofiliziranog ekstrakta. Rezultati fizikalno-kemijske karakterizacije pripremljenih liposoma (veličina, zeta potencijal i indeks polidisperzije) prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Veličina, zeta potencijal i indeks polidisperzije pripremljenih liposoma

Omjer masa Phospholipon 90G i ekstrakta	Veličina (nm)	Zeta potencijal (mV)	Indeks polidisperzije
Prazni liposomi	316,1 ± 6,4	-31,2 ± 0,5	0,369 ± 0,043
Liposomi (1:5)	317,6 ± 5,8	-29,4 ± 0,5	0,338 ± 0,007
Liposomi (1:10)	319,1 ± 1,7	-27,3 ± 1,6	0,333 ± 0,045
Liposomi (1:20)	350,8 ± 7,2	-22,3 ± 1,7	0,303 ± 0,01

Veličina liposoma i indeks polidisperzije su parametri kojima se može opisati veličina i ujednačenost (homogenost) liposoma jer što su veličina i indeks polidisperzije manji, to je uzorak liposoma stabilniji (Luo i sur., 2020). S druge strane, zeta potencijal je parametar koji daje informaciju o naboju na površini čestice – što je veća apsolutna vrijednost zeta potencijala, odbijanje između čestica je jače, te je uzorak liposoma stabilniji (Luo i sur., 2020).

Proučavajući rezultate iz Tablice 5, vidljivo je da je najmanja veličina liposoma određena u praznim liposomima (316,1 ± 6,4 nm), a najveća u liposomima s najmanjom količinom ekstrakta (350,8 ± 7,2 nm). Najveća apsolutna vrijednost zeta potencijala određena je u praznim liposomima (-31,2 ± 0,5 mV), a najmanja u liposomima s najmanjom količinom ekstrakta (-22,3 ± 1,7 mV). Štoviše, apsolutna vrijednost zeta potencijala se povećava povećanjem mase inkapsuliranog materijala. Indeks polidisperzije je (kao i apsolutna vrijednost zeta potencijala) najveći kod praznih liposoma (0,369 ± 0,043), a najmanji kod liposoma s najmanjom masom ekstrakta (0,303 ± 0,01). Najviša vrijednost indeksa polidisperzije koja je određena kod praznih liposoma može biti uzrok oksidacijske degradacije liposoma, do koje je došlo jer u liposomima nije bilo antioksidacijskih komponenata koje bi sprječile njihovu degradaciju te je distribucija čestica mnogo šira. Slične rezultate dobili su i Gibis i suradnici (2013), koji su uočili da liposomi bez inkapsuliranih polifenola pokazuju najveću vrijednost polidisperzije.

Luo i suradnici (2020) u svojem su radu kao dvije glavne komponente za formulaciju liposoma koristili kolesterol i lecitin (u više različitih omjera), a rezultati su pokazali da kada je

omjer kolesterola i lecitina prelazio 1:15, veličina čestica i indeks polidisperzije su se znatno povećali, a zeta potencijal smanjio, odnosno liposomi su bili nestabilniji. Ovaj fenomen je već objašnjen u jednom od prijašnjih radova kojeg su proveli Pinto i suradnici (2018) koji su zabilježili smanjenje veličine čestica sa povećanjem udjela tekućih lipida u liposomima, budući da se tekući lipidi lakše raspodjeljuju u vodenoj fazi što rezultira stvaranjem manjih liposoma.

4.4 Karakterizacija inkapsulacijske učinkovitost liposomnih sustava

Inkapsulacijska učinkovitost je pokazatelj koliko se bioaktivnih spojeva ekstrakta uspješno inkapsuliralo u liposome (ili u bilo koji drugi materijal koji se koristi za inkapsulaciju). Rezultati inkapsulacijske učinkovitosti za liposome pripremljene na 3 različita načina mijenjajući omjer mase fosfolipida i liofiliziranog ekstrakta kore banane prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Inkapsulacijska učinkovitost (%) liposoma pripremljenih na 3 različita načina mijenjajući omjer mase fosfolipida i liofiliziranog ekstrakta (1:5, 1:10 i 1:20)

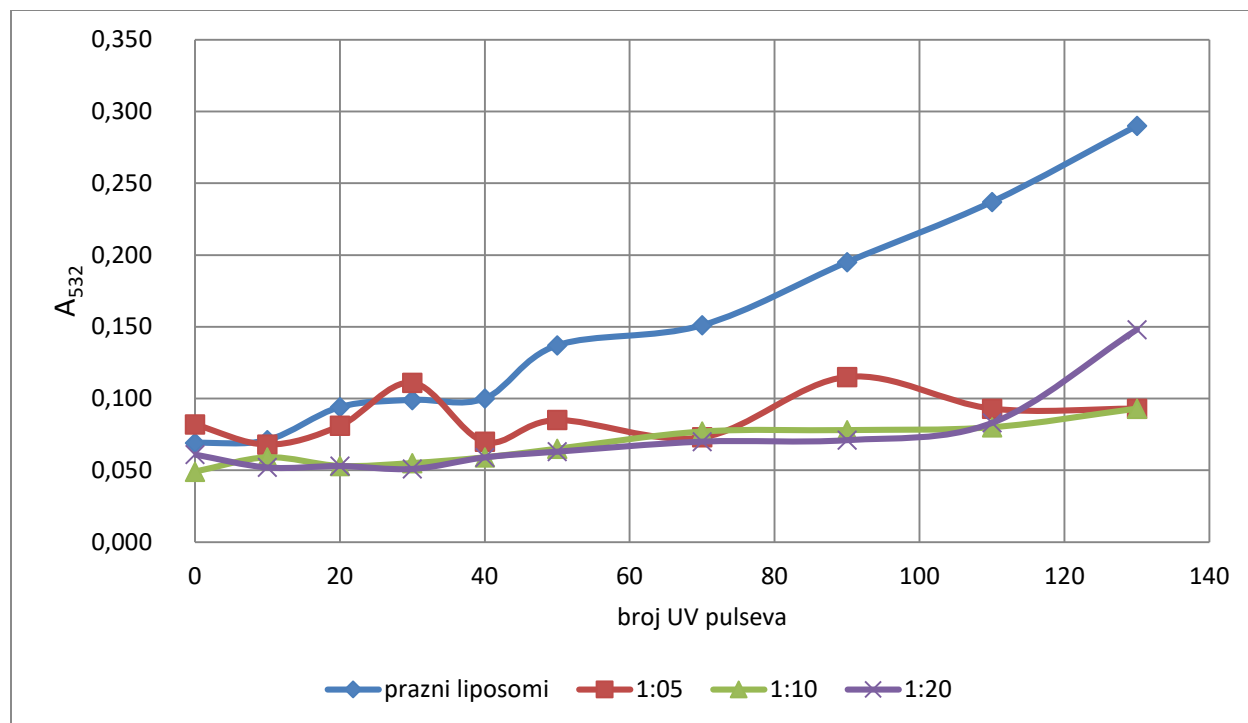
Inkapsulacijska učinkovitost (%)				
fosfolipid: ekstrakt	TPC	DPPH	ABTS	dopamin
1:5	33,71	36,54	35,24	35,10
1:10	45,93	36,19	33,58	38,42
1:20	35,39	37,23	33,67	41,12

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je inkapsulacijska učinkovitost bioaktivnih spojeva kore banane relativno niska. Najviša inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola određena je u liposomima u kojem je omjer mase fosfolipida i ekstrakta iznosio 1:10 (45,93%). Najviša inkapsulacijska učinkovitost glede antioksidacijskog kapaciteta, određena DPPH metodom, karakterizira uzorak u kojem je omjer masa iznosio 1:20 (37,23%), dok je primjenom ABTS metode, najviši antioksidacijski kapacitet imao uzorak u kojem je omjer masa iznosio 1:5 (35,24%). S druge strane, najviša inkapsulacijska učinkovitost dopamina određena je u uzorku u kojem je omjer masa iznosio 1:20 (41,12%), a najmanja u uzorku u kojem je omjer masa iznosio 1:5 (35,10%). Paini i suradnici (2015) razvili su metodu inkapsulacije apigenina liposomima kod koje je inkapsulacijska učinkovitost bila viša od 92%, iz čega se može zaključiti

da inkapsulacijska učinkovitost primjenom odgovarajućih uvjeta može biti iznimno visoka. Chen i suradnici (2019) proveli su ko-inkapsulaciju kvercetina i epigalokatehin galata (EGCG) liposomima, te dobili inkapsulacijsku učinkovitost od $64,05 \pm 1,56\%$ za EGCG, odnosno $61,73 \pm 2,55\%$ za kvercetin. Nadalje, inkapsulacijska učinkovitost se nakon 30 dana skladištenja proizvoda povećala za 4,05%, bez znatne promjene fizikalno-kemijskih karakteristika liposoma (indeksa polidisperzije i zeta potencijala), što upućuje na izrazito visoku stabilnost formuliranih liposoma (Chen i sur., 2018). Gibis i suradnici (2013) također su zabilježili iznimno visoku inkapsulacijsku učinkovitost pri inkapsulaciji polifenola iz ekstrakta sjemenki grožđa, koja je iznosila 92,2%, a sam proizvod bio je stabilan tijekom 98 dana skladištenja.

4.5. TBARS metoda

TBARS metoda koristila se za određivanje lipidne peroksidacije, a princip same metode temelji se na reakciji tiobarbiturne kiseline s malondialdehidima, karbonilnim produktima peroksidacije lipida (Janero, 1990), koja se u ovome radu inducirala kratkotrajnim djelovanjem UV svjetla na uzorke liposoma. Reakcija rezultira ružičasto obojenim kompleksom čiji se intenzitet određuje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 532 nm (Balanč i sur., 2015). Rezultati TBARS-a prikazani su na Slici 11.



Slika 10. Rezultati TBARS metode

Iz rezultata na Slici 11 vidljivo je da prazni liposomi pripremljeni bez dodatka ekstrakta kore banane pokazuju mnogo veću apsorbanciju (izmjerenu na 532 nm) pri većoj količini UV zračenja od ostalih, što znači da se u tom uzorku nalazi više obojenih karbonilnih produkata peroksidacije lipida. Iz navedenog se može zaključiti da su prazni liposomi podložniji reakcijama peroksidacije jer ne sadrže inkapsulirane polifenole koji bi ih od te reakcije zaštitili, budući da su polifenoli izrazito dobri antioksidansi. Tome u prilog ide i činjenica da su uzorci sa liposomima koji sadrže inkapsulirane polifenole kore banane pokazali znatno manju apsorbanciju na 532 nm, odnosno u njima se reakcija peroksidacije nije provela do neke znatnije mjere. Nadalje, od tri uzorka liposoma s inkapsuliranim polifenolima, uzorak pripremljen s dodatkom najmanje mase liofiliziranog ekstrakta je pri izlaganju 130 UV pulseva pokazao nešto veću apsorbanciju na 532 nm od ostala dva uzorka liposoma (vrijednost A_{532} od 0,148 u usporedbi sa 0,093), što ukazuje na činjenicu da veća količina inkapsuliranih polifenola može bolje zaštititi liposome od oksidacije pri izlaganju većoj količini UV zračenja. Iz rezultata dobivenih TBARS metodom može se zaključiti da inkapsulirani polifenolni spojevi kore banane posjeduju visoki antioksidacijski kapacitet te da doprinose inhibiciji stvaranja malondialdehida i zaštititi liposoma od peroksidacije.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog završnog rada doneseni su sljedeći zaključci:

1. Postupak blanširanja uspješno je inaktivirao polifenol-oksidadu, odgovornu za enzimsko posmeđivanje kore banane, dok je liofilizacija uspješno eliminirala štetan utjecaj kisika i visokih temperatura tijekom sušenja na stabilnost polifenolnih spojeva kore banane.
2. U pogledu ekstrakcijske učinkovitosti polifenolnih spojeva kore banane, konvencionalne tehnike, posebice dekokcija, pokazale su se uspješnijima od inovativnih tehnika ekstrakcija.
3. Kora banane predstavlja vrijedan izvor snažnog antioksidansa- dopamina.
4. Relativno loša inkapsulacijska učinkovitost dopamina u liposome može se pripisati izrazito hidrofilnom karakteru dopamina.
5. Prema određenim fizikalno-kemijskim svojstvima, formulirani liposomi su stabilni.
6. Inkapsulirani polifenolni spojevi kore banane posjeduju visoki antioksidacijski kapacitet te doprinose zaštiti liposoma od peroksidacije.

6. LITERATURA

Abbas M., Saeed F., Anjum F.M., Afzaal M., Tufail T., Bashir M.S., Ishtiaq A., Hussain S., Suleria H.A.R. (2017) Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties* **20(8)**: 1689 – 1699.

Aliakbarian B., Fathi A., Perego P., Dehghani (2012) Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids* **65**: 18 – 24.

Anekpankul T., Goto M., Sasaki M., Pavasant P., Shotipruk A. (2007) Extraction of anti-cancer damnacanthal from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water. *Separation and Purification Technology* **55**: 343 – 349.

Annadurai G., Juang R.-S., Lee D.-J. (2002) Use of cellulose-based wastes for adsorption of dyes from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* **B92**: 263 – 274.

Augustin M. A., Hemar Y. (2009) Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews* **38**: 902 - 912.

Bai X.-L., Yue T.-L., Yuan Y.-H., Zhang H.-W. (2010) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. *Journal of Separation Science* **33**: 3751 - 3758.

Balanč B. D., Ota A., Djordjević V.B., Šentjerc M., Nedović V.A., Bugarski B.M., Ulrih N.P. (2015) Resveratrol-loaded liposomes: Interaction of resveratrol with phospholipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* **117**: 1615 – 1626.

Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **13**: 238 - 252.

Bhandari B. R., D'Arcy B. D., Padukka I. (1999) Encapsulation of lemon oil by paste method using β -cyclodextrin: encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 5194 - 5197.

Boots A. W., Haenen G. R., Bast A. (2008) Health effects of quercetin: From anti-oxidant to nutraceutical. *European Journal Pharmacology* **585(2-3)**: 235 - 337.

- Bouras M., Chadni M., Barba F. J., Grimi N., Bals O., Vorobiev E. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products* **77**: 590 - 601.
- 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.
- Brusotti G., Cesari I., Dentamaro A., Gaccialanza G., Massolini G. (2014) Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **87**: 218 - 228.
- Chen W., Zou M., Ma X., Lv R., Ding T., Liu D. (2019) Co-encapsulation of EGCG and quercetin in liposomes for optimum antioxidant activity. *Journal of Food Science* **84**: 111 - 120.
- Cheng J.-C., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z.-L. (2007) Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship. *Food Chemistry* **104(1)**: 132 - 139.
- Coradini K., Lima F. O., Oliveira C. M., Chaves P. S., Athayde M. L., Carvalho L. M., Beck R. C. R. (2014) Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics* **88**: 178 - 185.
- d'Alessandro L. G., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K. (2012) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology* **93**: 42 - 47.
- Del Caro A., Piga A. (2008) Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fruits cultivars (*Ficus carica* L.). *European Food Research and Technology* **226**: 715 – 719.
- Delgado-Vargas F., Jimenez A. R., Pardes-Lopez O. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalainsecharacteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**: 173 - 289.
- Desai K. G. H., Park H. J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **23**: 1361 - 1394.

Dziezak J. D. (1998) Microencapsulation and encapsulated food ingredients. *Food Technology* **42**: 136 - 151.

Dorđević 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 Eng Rev* **7**: 452 – 490.

Emami S., Azadmard-Damirchi S., Peighambaroust S.-H., Valizadeh H., Hesari J. (2016) Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *Journal of Experimental Nanoscience* **11(9)**: 737 – 759.

Erşan S., Güçlü Üstündağ O., Carle R., Schweiggert R.M. (2018) Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. *Food Chemistry* **253**: 46 – 54.

Eskilsson C. S., Björklund E. (2000) Analytical-scale microwaveassisted extraction. *Journal of Chromatography A* **902**: 227 - 250.

FAO (2019) Banana facts and figures. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.X1oTdlUzbIU> Pristupljeno 10. kolovoza 2020

Fang Z., Bhandari B. (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology* **21**: 510 – 523.

Georgetti S. R., Casagrande R., Souza C. R. F., Oliveira W. P., Fonseca M. J. V. (2008) Spray drying of the soybean extract: effects on chemical properties and antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **41**: 1521 - 1527.

Gibbs B. F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C. N. (1999) Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **50**: 213 - 224.

Giomaro G., Karioti A., Bilia A.R., Bucchini A., Giamperi L., Ricci D., Fraternali D. (2014) Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy). *Chemistry Central Journal* **8(45)**.

- Jackson T., Badrie N. (2003) Utilization of banana (*Musa acuminata*) peel in wine produced in the Caribbean: Effects on physico-chemical, microbiological and sensory quality of wines. *Journal of food science and technology* **40 (2)**: 153 – 156.
- Janero D. R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity. *Free Radical Biology and Medicine* **9**: 515 – 540.
- Kaderides K., Papaoikonomou L., Serafim M., Goula A. M. (2019) Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* **137**: 1 - 11.
- Kalemelawa F., Nishihara E., Endo T., Ahmad Z., Yeasmin R., Tenywa M. M., Yamamoto S. (2012) An evaluation of aerobic and anaerobic composting of banana peels treated with different inoculums for soil nutrient replenishment. *Bioresource Technology* **126**: 375 - 382.
- Karthikeyan A., Sivakumar N. (2010) Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. *Bioresource Technology* **101(14)**: 5552 - 5556.
- Kaufmann B., Christen P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis* **13**: 105 - 113.
- Kosaraju S. L., D'ath L., Lawrence A. (2006) Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers* **64**: 163 - 167.
- Lucas-Abellán C., Fortea M. I., López-Nicolàs J. M., Núñez-Delicado E. (2007) Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chemistry* **104**: 39 - 44.
- Luo M., Zhang R., Liu L., Chi J., Huang F., Dong L., Ma Q., Jia X., Zhang M. (2020) Preparation, stability and antioxidant capacity of nano liposomes loaded with procyanidins from lychee pericarp. *Journal of Food Engineering* **284**
- Ma Y., Ye X., Hao Y., Xu G., Xu G., Liu D. (2008) Ultrasound assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason Sonochem* **15**: 227 – 232.

- Meena R. K., Sahu R., Shukla P., Thakr S. (2015) Bio-ethanol production from lignocellulosic banana waste using co-culture techniques. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, **9(3)**: 259 - 265.
- Mercader-Ros M. T., Lucas-Abellán C., Fortea M. I., Gabaldón J. A., Núñez-Delicado E. (2010). Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry* **118**: 769 - 773.
- Milutinović M., Radovanović N., Rajilić-Stojanović M., Šiler-Marinković S., Dimitrijević S., Dimitrijević-Branković S. (2014) Microwave-assisted extraction for the recovery of antioxidants from waste *Equisetum arvense*. *Industrial Crops and Products* **61**: 388 - 397.
- Mirabella N., Castellani N.V., Sala S. (2014) Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production* **65**: 28 - 41.
- Mohapatra D., Misham M., Sutar N. (2010) Banana and its by-product utilisation: an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research* **69**: 323 - 329.
- Mozafari M. R., Khosravi-Darani K., Borazan G. G., Cui J., Pardakhty A., Yurdugul S. (2008) Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties* **11**: 833 - 844.
- Mozafari M.R., Johnson C., Hatziantoniou S. (2008) Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research* **18**: 309 - 327.
- Okafor U., Okochi V., Onyegeme-Okerenta B., & Nwodo-Chinedu S. (2007) Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. *African Journal of Biotechnology*, **6(14)**
- Osma J. F., Herrera J. L. T., Couto S. R. (2007) Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. *Dyes and Pigments* **75(1)**: 32 - 37.
- Pathak P. D., Mandavgane S. A., Kulkarni B. D. (2016) Utilization of banana peel for the removal of benzoic and salicylic acid from aqueous solutions and its potential reuse. *Desalination and Water Treatment* **57**: 12717-12729.

Pinela J., Prieto M. A., Barreriro A. M., Carvalho M. B. P. P., Oliveira J.A. Vázquez, Ferreira I. C. F. R. (2016) Optimization of microwave-assisted extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from a surplus tomato crop by response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology* **98**: 283 - 298.

Ramli S., Alkarkhi A. F. M., Shin Yong Y., Min-Tze L., Easa A. M. (2009) Effect of banana pulp and peel flour on physicochemical properties and in vitro starch digestibility of yellow alkaline noodles. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **60**: 326–340.

Ramos L., Kristenson E. M., Brinkman U. A. (2002). Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* **975**: 3 – 29.

Rodsamran P., Sothornvit R. (2019) Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience* **28**: 66 - 73.

Rostagno M. A., Palma M., Barroso C. G. (2003) Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography* **1012**: 119 - 128.

Schäfer V., von Briesen H., Andreesen R., Steffan A. M., Royer C., Tröster S. (1992). Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. *Pharmaceutical Research* **9**: 541 - 546.

Schrooyen P. M. M., van der Meer R., De Kruif C. G. (2001) Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* **60**: 475 - 479.

Shalmashi A., Abedi M., Golmohammad F., Eikani M. H. (2007) Isolation of caffeine from tea waste using subcritical water extraction. *Journal of Food Processing Engineering* **33**: 701 - 711.

Sharrock S., Lustry C. (2000) Nutritive value of banana. *INIBAP Annual Report* 28-31

Shutava T. G., Balkundi S. S., Lvov Y. M. (2009) (-)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. *Journal of Colloid and Interface Science* **330**: 276 - 283.

Singh P. P., Saldana M.D.A. (2011) Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International* **44**: 2452 – 2458.

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

Sodchit C., Tochampa W., Kongbangkerd T., Singanusong R. (2013) Effect of banana peel cellulose as a dietary fiber supplement on baking and sensory qualities of butter cake. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **35 (6)**: 641 – 646.

Someya S., Yoshiki Y., Okubo K. (2002) Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). *Food Chemistry* **79**: 351 – 354.

Šubarić D., Babić J. (2019) Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije, knjiga 2. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.

Takahashi M., Inafuku K., Miyagi T., Oku H., Wada K., Imura T. (2007) Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *Journal of Oleo Science* **56**: 35 - 42.

Takahashi M., Uechi S., Takara K., Asikin Y., Wada K. (2009) Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-capsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 9141 - 9146.

Tapre A.R., Jain R.K. (2014) Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal* **21(2)**: 447 – 453.

Taylor T.M., Gaysinsky S., Davidson P.M. (2007) Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by z-potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophys* **2**: 1 - 9.

Taylor T.M., Weiss J., Davidson P.M. (2005) Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**: 587 - 605.

Thies C. (2005) A survey of microencapsulation processes. In: Benita S (ed) Microencapsulation. Marcel Dekker Inc, New York

Thompson A.K. (2005) Structure and properties of liposomes prepared from milk phospholipids [PhD thesis]. Palmerston North: Massey University

Tiwari B. K. (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry* **71**: 100 - 109.

Tommasini S., Calabró M.L., Stancanelli R., Donato P., Costa C., Catania S., Villari V., Ficarra P., Ficarra R. (2005) The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis* **39**: 572 – 580.

Turner C., Turner P., Jacobson G., Almgren K., Waldebäck M., Sjöberg P., Karlsson E. N., Markides K. E. (2006) Subcritical water extraction and β -glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. *Green Chem* **8**: 949 – 959.

Virost M., Tomao V., Le Bourvellec C., Renard C. M. C. G., Chemat F. (2010) Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason Sonochem* **17**: 1066 - 1074.

Vu H. T., Scarlett C. J., Voung Q. V. (2018) Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *Journal of Functional Foods* **40**: 238 - 248.

Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y., Li X. (2008) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem* **106**: 804 – 810.

Wijngaard H.H., Rößle C., Brunton N. A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* **116**: 202 – 207.

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.

Jakov Cvetković

Ime i prezime studenta