

# Inkapsulacija ekstrakata ružmarina dobivenih visokonaponskim električnim pražnjenjem

---

**Kučljak, Damir**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:159:184543>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO- BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, kolovoz 2021

Damir Kucljak

1357/ PI

**INKAPSULACIJA EKSTRAKATA  
RUŽMARINA DOBIVENIH  
VISOKONAPONSKIM  
ELEKTRIČNIM PRAŽNJENJEM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj na Zavodu za opće programe Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Marinele Nutrizio, mag. nutr.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na stručnom vodstvu tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se Marineli Nutrizio, mag. nutr. na pomoći i savjetima tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Hvala obitelji na strpljenju, savjetima i bezuvjetnoj podršci, prijateljima koji su uvijek bili uz mene i svima ostalima bez kojih ne bih završio PBF.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za opće programe

Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## INKAPSULACIJA EKSTRAKATA RUŽMARINA DOBIVENIH VISOKONAPONSKIM ELEKTRIČNIM PRAŽNENJEM

*Damir Kucljak, 1357/ PI*

### Sažetak:

Cilj ovog rada bila je inkapsulacija ekstrakata dobivenih pomoću visokonaponskih pražnjenja električne struje koristeći različite omotače. Napravljene su četiri vrste kapsula- jedna je sadržavala samo natrijev alginat, druga natrijev alginat i hidrokispropil metil celulozu (HPMC), treća natrijev alginat i zein, a četvrta natrijev alginat, HPMC i zein. Kapsulama su određivana fizikalna i kemijska svojstva. Uz to, provedena su otpuštanja polifenola u vodi, klorovodičnoj kiselini i puferu. Otpuštanja su rađena kroz vremenski period od 120 minuta te su nakon 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 i 120 minuta uzimani uzorci za mjerenje udjela polifenola. Dodatkom zeina i HPMC- a usporeno je otpuštanje polifenola iz kapsula. Iz kapsula su polifenolni spojevi najbrže otpušteni u fosfatnom puferu. Kapsule sa zeinom imale su veći udio proteina i veći kapacitet punjenja u odnosu na kapsule koje nisu sadržavale zein. Kapsule s HPMC- om pokazale su veći postotak bubrenja i izmjeren im je veći radijus u odnosu na kapsule koje nisu sadržavale HPMC. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da postoji potencijal za korištenje dobivenih kapsula u ljudskoj prehrani.

**Ključne riječi:** *ekstrakcija, visokonaponska pražnjenja električne struje, inkapsulacija, otpuštanje, polifenoli*

**Rad sadrži:** 46 stranica, 24 slike, 6 tablica, 45 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc., *Anet Režek Jambrak*

**Pomoć pri izradi:** *Marinela Nutrizio*, mag. nutr.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Mia Kurek*
2. Prof.dr.sc. *Anet Režek Jambrak*
3. Izv.prof.dr.sc.. *Marko Vinceković* (Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)
4. Izv.prof.dr.sc. *Mojca Čakić Semenčić* (zamjena)

**Datum obrane:** Rujan, 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department for General Programmes

Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

### ENCAPSULATION OF ROSEMARY EXTRACTS OBTAINED USING HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGES

*Damir Kucljak, 1357/ PI*

#### Abstract:

The aim of this study was to encapsulate rosemary extracts obtained by high voltage electrical discharges using different coatings. Four types of capsules were made- one with sodium alginate, one with sodium alginate and hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC), one with sodium alginate and zein, and one with sodium alginate, HPMC and zein. The physical and chemical properties of the capsules were determined. Also, the release of polyphenols from the capsules in water, hydrochloric acid and in phosphate buffer was studied. The releases were studied in a time period of 120 minutes in which samples were taken after 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 minutes for total phenolic content analysis. Adding zein and HPMC slowed down the release of polyphenols from the capsules. The fastest release of polyphenols was measured in the phosphate buffer. Capsules with a zein coating had more protein in their composition and a bigger loading capacity when compared to capsules without zein. Capsules with a HPMC coating were bigger and had better swelling when compared to capsules without HPMC. The obtained results showed that there is potential for using these capsules in human diet.

**Keywords:** *extraction, high voltage electrical discharges, encapsulation, release, polyphenols*

**Thesis contains:** 46 pages, 24 figures, 6 tables, 45 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD *Anet Režek Jambrak*, Full Professor

**Technical support and assistance:** *Marinela Nutrizio*, MSc

#### Reviewers:

1. PhD. *Mia Kurek*, Assistant professor
2. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Full professor
3. PhD. *Marko Vinceković*, Associate professor (Faculty of Agronomy, University of Zagreb)
4. PhD. *Mojca Čakić Semenčić*, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September, 2021.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2. 1. Ružmarin .....	2
2. 1. 1. Kemijski sastav ružmarina .....	2
2. 2. Polifenoli .....	4
2. 2. 1. Vrste polifenola .....	4
2. 2. 2. Antioksidacijsko djelovanje polifenola .....	6
2. 3. Ekstrakcija .....	7
2. 3. 1. Visokonaponska pražnjenja električne struje (eng. <i>High voltage electrical discharges- HVED</i> ) .....	8
2. 3. 2. Uređaji za HVED .....	10
2. 4. Inkapsulacija .....	13
2. 4. 1. Metode inkapsulacije .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
3. 1. Materijali .....	17
3. 1. 1. Uzorci .....	17
3. 1. 2. Reagensi .....	17
3. 1. 3. Laboratorijski uređaji i posude .....	18
3. 2. Metode rada .....	18
3. 2. 1. Ekstrakcija .....	18
3. 2. 2. Inkapsulacija .....	19
3. 3. 3. Otpuštanje polifenola iz kapsula .....	20
3. 3. 4. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....	21
3. 3. 5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	23
3. 3. 6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	24
3. 3. 7. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry- u .....	25
3. 3. 8. Bubrenje kapsula .....	26
3. 3. 9. Mjerenje promjera kapsula .....	26
3. 3. 10. Pretražni elektronski mikroskop (eng. <i>Scanning electron microscopy- SEM</i> ) .....	27
3. 3. 11. Statistička obrada podataka .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	31
4. 1. Kemijska analiza ekstrakta ružmarina .....	31
4. 2. Fizikalna svojstva kapsula .....	31
4. 3. Kemijska svojstva kapsula .....	36
4. 4. Otpuštanje polifenola iz kapsula u različitim medijima .....	37
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	41
<b>6. LITERATURA</b> .....	42



# 1. UVOD

U doba kada svakodnevno raste svijest potrošača o hrani koju unose u svoj organizam, prehrambena industrija nailazi na izazov. Potrošači žele prirodnu hranu sa što manje sintetskih dodataka, upravo zato su biljke poput ružmarina podvrgnute brojnim istraživanjima. Ružmarin je biljka koja se koristi u ljudskoj prehrani još od antičkih vremena. Najčešće se koriste sušeni listovi ružmarina kao začim (Sasikumar, 2012). Bogat je prirodnim antioksidansima koji su potrošačima poželjniji od sintetskih antioksidansa (Mena i sur., 2016).

Kako bi se hrana obogatila takvim prirodnim sastojcima, prehrambena industrija pronalazi inovativne i održive metode pomoću kojih će potrošačima predstaviti zadovoljavajuće proizvode. Jedna od tih metoda je ekstrakcija pomoću visokonaponskih pražnjenja električne struje (eng. *High voltage electrical discharges*- HVED). Takva ekstrakcija primjer je ekološki prihvatljive, netoplinske metode koja omogućuje bolje iskorištenje u odnosu na klasične metode ekstrakcije (Xi i sur., 2017; Boussetta i Vorobiev, 2014).

Kako bi se postiglo maksimalno iskorištenje polifenolnih spojeva iz dobivenog ekstrakta u organizmu, provodi se inkapsulacija. Inkapsulacija ekstrakta omogućuje produljenje roka trajanja ekstrakta i njegovo kontrolirano otpuštanje u organizmu. Inkapsulacijom se ekstrakt može dovesti u oblik kapsula koji je prihvatljiv potrošaču. Tako se dobiva poželjan proizvod kojim se hrana može obogatiti (Arriola i sur., 2016; Najafi-Soulari i sur., 2016; Fang i Bhandari, 2010).

Cilj ovog rada bila je inkapsulacija ekstrakata ružmarina dobivenih pomoću HVED- a koristeći različite omotače te analiza dobivenih kapsula. Provedeno je mjerenje fizikalnih i kemijskih svojstava kapsula, a zatim je analizirano otpuštanje polifenolnih spojeva iz kapsula u vodi, klorovodičnoj kiselini i fosfatnom puferu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2. 1. Ružmarin

Riječ ružmarin potječe od latinske riječi „*rosmarinus*“ što znači morska rosa. Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis* L.) potječe s područja Mediterana te se danas uzgaja u Španjolskoj, Maroku, Tunisu, Francuskoj, Alžiru, Portugalu, Italiji itd. Ružmarin je gusta, zimzelena, aromatična trajnica koja raste u visinu od 60-200 cm (slika 1). Ima male (2-4 cm) zašiljene listove. Gornja strana lista je tamnozeleno, a naličje svijetlo zeleno. Stabljike biljke su smeđe i drvene, a cvjetovi mogu biti bijeli, plavi ili ljubičasti (Sasikumar, 2012). Ružmarin cvjeta dva puta godišnje, u travnju i rujnu, a cvjetovi su dvousnati. U ljekovite svrhe koriste se listovi ružmarina i eterično ulje dobiveno destilacijom listova. Listovi ružmarina često se koriste kao začini u jelima od ribe i mesa (Dragović- Uzelac, 2019). Budući da sadrže antioksidanse često se koriste i u procesiranju hrane i kozmetici. Zbog svojih diuretskih, antidepresivnih, antibakterijskih i drugih svojstava ružmarin je često korišten i u alternativnoj medicini (Mena i sur., 2016). Antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje ekstrakta ružmarina ovisi o više faktora kao što su: vrsta ekstrakcije, prisutnost inhibitora, koncentracija aktivnih komponenti itd. Te faktore treba uzeti u obzir kada se ekstrakti primjenjuju u prehrambenoj industriji (Nieto i sur., 2018).



Slika 1. Stabljika ružmarina (Dragović- Uzelac, 2019)

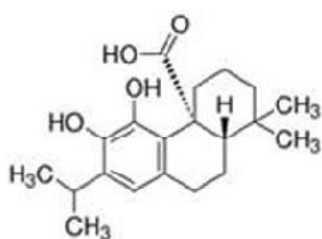
#### 2. 1. 1. Kemijski sastav ružmarina

Biološka svojstva ružmarina pripisuju se njegovom sastavu koji je bogat polifenolima. Sastav osušenog lista ružmarina prikazan je u tablici 1. Fenolna frakcija ekstrakta ružmarina sadrži 57 fenolnih spojeva koji pripadaju različitim skupinama (24 flavonoida, 5 fenolnih kiselina, 24 diterpena, 1 triterpenska kiselina te 3 lignana). Diterpeni su glavna fenolnih spojeva (97,2 %) (Mena i sur., 2016). Najzastupljeniji polifenoli u ružmarinu su karnozinska kiselina i

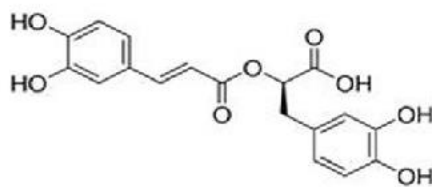
karnozol te antioksidativni terpeni kao što su epirozmanol, izorozmanol, rozmaridifenol, rozmarikinin i ružmarinska kiselina (Sasikumar, 2012). Kemijske strukture najzastupljenijih polifenola u ružmarinu prikazane su na slici 2.

Tablica 1. Sastav osušenog lista ružmarina (Sasikumar, 2012)

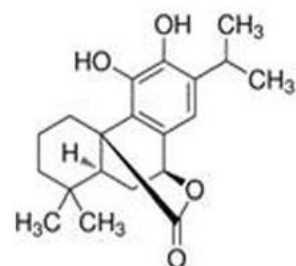
TVAR	UDIO
Vlaga	5,7 %
Proteini	4,5 %
Masnoće	17,7 %
Sirova vlakna	19 %
Ugljikohidrati	47,4 %
Pepeo	6 %
Kalcij	1,5 %
Fosfor	0,7 %
Željezo	0,003 %
Natrij	0,004 %
Kalij	1 %
Vitamin A	175 IU 100 g <sup>-1</sup>
Vitamin B	0,51 mg 100 g <sup>-1</sup>
Vitamin C	61,3 mg 100 g <sup>-1</sup>
Energija	440 kalorija 100 g <sup>-1</sup>



Karnozinska kiselina



Ružmarinska kiselina



Karnozol

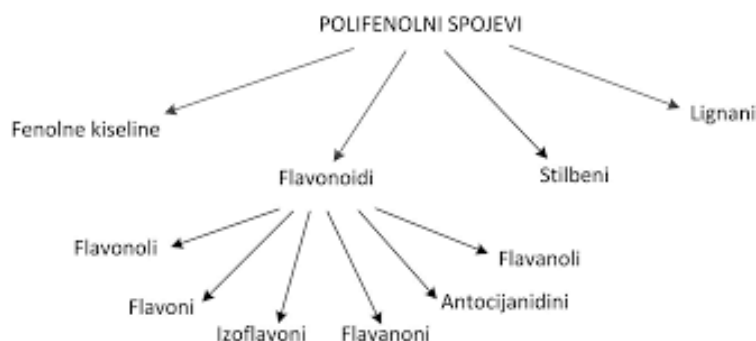
Slika 2. Kemijske strukture najzastupljenijih polifenola u ružmarinu (De Oliveira i sur., 2019)

## 2. 2. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti koje biljke proizvode kako bi se zaštitile od drugih organizama. Oni su jedna od najvećih i najrasprostranjenijih skupina sekundarnih biljnih metabolita (Tsao, 2010). Glavni razlozi interesa potrošača i znanstvenika za polifenole su njihova antioksidacijska svojstva, široka rasprostranjenost u prehrani te mogućnosti u sprječavanju bolesti povezanih s oksidacijskim stresom kao što su kardiovaskularne bolesti, rak i neurodegenerativne bolesti. Fenolni spojevi u biljkama mogu nastati na dva različita načina: šikiminski i acetatni biosintetski put. Šikiminskim putem uglavnom nastaju fenilpropanoidi, dok acetatnim putem nastaju jednostavni fenoli. Kombinacijom oba metabolička puta nastaju flavonoidi, a to je najveća skupina polifenola. Biosintetskim putem do sinteze flavonoida, nastaju kondenzirani tanini i tanini netopljivi u vodi (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Hrana bogata polifenolnim spojevima uglavnom je biljnog porijekla – voće, povrće i cjelovite žitarice, a možemo ih pronaći i u čajevima, čokoladi te vinu (Tsao, 2010).

### 2. 2. 1. Vrste polifenola

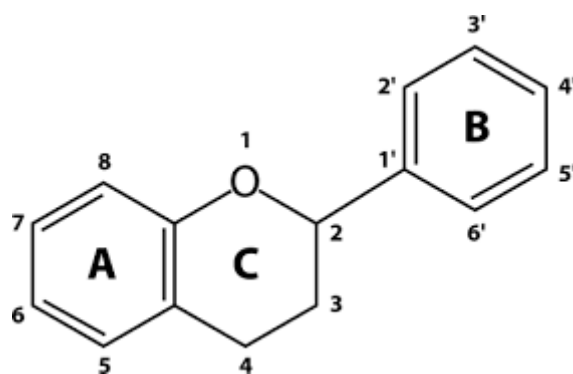
Vrste polifenola razlikuju se prema porijeklu, prirodnoj rasprostranjenosti, biološkoj funkciji ili kemijskoj strukturi. Prema rasprostranjenosti polifenoli se dijele u tri skupine: slabo rasprostranjeni (npr. jednostavni fenoli), dobro rasprostranjeni (npr. flavonoidi i njihovi derivati, fenolne kiseline i njihovi derivati) te polimeri (tanini i lignani) (Tsao, 2010). Najčešće korištena klasifikacija polifenola je klasifikacija prema kemijskoj strukturi te je prikazana na slici 3. Klasifikacija prema kemijskoj strukturi razlikuje se od autora do autora, ali u osnovici polifenoli se klasificiraju u fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, lignane i ostale polifenole (Belščak- Cvitanović i sur., 2018).



Slika 3. Podjela polifenola prema kemijskoj strukturi (Krešić, 2017)

Flavonoidi su najraširenija i najproučavanija skupina polifenola (Belščak- Cvitanović i sur., 2018). Njihova osnovna kemijska struktura prikazana je na slici 4. Prema stupnju

hidroksilacije u molekuli i prisustvu C<sub>2</sub>- C<sub>3</sub> dvostruke veze u heterocikličkom pironskom prstenu, flavonoidi se mogu podijeliti na 13 skupina od kojih su najvažnije: flavanole, flavone, izoflavone, flavonole, antocijanidine i flavanone (Abbas i sur., 2017). Antocijanidini su glavna komponenta pigmenta plave, crvene i ljubičaste boje u većini latica, voća i povrća. Flavanoli se često nazivaju i katehini. Imaju dva kiralna centra te zbog toga mogu imati *trans* i *cis* konfiguraciju. Kada imaju *cis* konfiguraciju nazivamo ih epikatehini. Flavanole nalazimo u voću, posebice u pokožici borovnice i kori jabuke. Izoflavone najčešće nalazimo u mahunarkama. Najrašireniji izoflavoni su genistein i daidzein (Tsao, 2010).



Slika 4. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Martens i Mithöfer, 2005)

Fenolne kiseline su spojevi koji imaju benzenski prsten, karboksilnu skupinu i jednu ili više hidroksilnih skupina. Uz to može sadržavati i jednu ili više metoksilnih skupina. Fenolne kiseline možemo podijeliti na hidroksibenzojeve kiseline i njihove derivate te hidroksicimetne kiseline i njihove derivate (Abbas i sur., 2017).. Hidroksibenzojeve kiseline sadrže sedam ugljikovih atoma te su najjednostavnije fenolne kiseline koje nalazimo u prirodi. Hidroksicimetne kiseline sadrže devet ugljikovih atoma te ih u prirodi najčešće nalazimo u obliku estera. Fenolne kiseline sačinjavaju trećinu fenolnih spojeva u ljudskoj prehrani i karakterizira ih jaka antioksidacijska aktivnost. Na antioksidacijsku aktivnost utječe broj hidroksilnih skupina u molekuli (Belščak- Cvitanović i sur., 2018).

Lignani se sastoje od dvije jedinice fenilpropana. Nalazimo ih u sjemenkama žitarica i voća, a najvećim udjelom nalaze se u lanenom sjemenu. Stilbeni su spojevi koji imaju vrlo mali udio u ljudskoj prehrani, a nalazimo ih u malim udjelima u vinu. Najvažniji spoj iz skupine stilbena u ljudskoj prehrani je resveratrol. Nalazi se u malom količinama u vinu te je tema mnogih istraživanja zbog svojih antikancerogenih svojstava (Belščak- Cvitanović i sur., 2018).

### 2. 2. 2. Antioksidacijsko djelovanje polifenola

Antioksidansi su molekule koje inhibiraju oksidaciju drugih molekula (Najafi-Soulari i sur., 2016). Oštećenja poput oksidacije molekula uzrokuju slobodni radikali. Slobodni radikali su vrlo reaktivne molekule koje sadrže nespareni elektron. Formiraju se na tri moguća načina: homolitičkim cijepanjem kovalentne veze molekule (svaki dio nastao cijepanjem postaje slobodni radikal), gubitkom jednog elektrona u molekuli ili dodatkom jednog elektrona u molekulu (Cheeseman i Slater, 1993). Molekule koje su najpodložnije oštećenjima djelovanjem slobodnih radikala su lipidi. Djelovanjem slobodnih radikala dolazi do peroksidacije lipida koja uzrokuje oštećenja stanične membrane te oštećenja na drugim stanicama proizvodnjom reaktivnih aldehida (Tsao, 2010). U obrani protiv slobodnih radikala ključni su antioksidansi poput polifenolnih spojeva (Cheeseman i Slater, 1993). Mehanizmi antioksidacijskog djelovanja polifenola mogu uključivati izravne reakcije s reaktivnim slobodnim radikalima, kelaciju iona metala koji sudjeluju u stvaranju slobodnih radikala, inhibiciju enzima koji sudjeluju u proizvodnji slobodnih radikala i regeneraciju membranski vezanih antioksidansa. Zbog slabe bioraspoloživosti polifenola, pretpostavlja se da većinu svoju antioksidacijske aktivnosti odrađuju u probavnu traktu (Belščak- Cvitanović i sur., 2018).

Postoje dva mehanizma reakcije antioksidansa sa slobodnim radikalima (Santos- Sanchez i sur., 2019). Prvi mehanizam se temelji na mogućnosti fenolne funkcionalne grupe da donira atom vodika slobodnom radikalumu te tako nevezani elektron u slobodnom radikalumu veže za vodik i zaustavlja lančanu reakciju oksidacije. Pritom polifenol postaje stabilni (manje aktivan) radikal (Belščak- Cvitanović i sur., 2018). U drugom mehanizmu odvija se prijenos jednog elektrona s polifenola na slobodni radikal te polifenol postaje stabilni kation. Polifenoli također djeluju zaustavljajući lančanu reakciju peroksidacije lipida donirajući elektron slobodnom radikalumu (Santos- Sanchez i sur., 2019).

Polifenoli koji sadrže 1, 2- dihidroksi,  $\alpha$ - hidroksiketo ili  $\beta$ - hidroksiketo skupinu ulaze u reakcije kelacije metala kao što su  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  i  $Cu^{+}$  (Belščak- Cvitanović i sur., 2018). Ti metali imaju važnu ulogu u formiranju slobodnih radikala. Kelacijom tih metala sprječava se oksidacija koju uzrokuju reaktivni radikali (Tsao, 2010). Uspješnost kelacije metala ovisi o broju hidroksilnih skupina i pH medija u kojem se reakcija odvija (Belščak- Cvitanović i sur., 2018).

Polifenoli često djeluju kao koantioksidansi te su uključeni u regeneraciju esencijalnih vitamina (Tsao, 2010). Točnije, hidrofilni polifenoli inhibiraju inicijaciju u vodenoj fazi, dok

lipofilni polifenoli (npr.  $\alpha$ - tokoferol) antioksidacijski djeluje u lipidnoj fazi na peroksidacijske radikale. Taj proces upućuje na regeneraciju antioksidansa (Belščak- Cvitanović i sur., 2018). Svojstvo polifenola, posebice flavonoida s nezasićenim C- prstenom, je njihov afinitet prema proteinima, uključujući enzime i receptore (Abbas i sur., 2017). Nekovalentne veze koje se stvaraju između polifenola i proteina uključuju vodikove veze koje se formiraju između atoma kisika iz hidroksilne skupine (-OH) ili dušika iz amino skupine (-NH<sub>2</sub>) i atoma vodika iz druge molekule polifenola ili iz molekule proteina. Takvim vezanjem polifenola na enzime ili receptore može doći do inhibicije (Belščak- Cvitanović i sur., 2018).

### 2. 3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija odjeljivanja smjese tvari koje imaju različitu topljivost u određenim otapalima (Drmić i Režek- Jambrak, 2010). Cilj ekstrakcije je izdvajanje bioaktivnih komponenti iz biljaka pomoću selektivnog otapala (Azwanida, 2015). U samoj ekstrakciji odvija se prijenos mase u tri koraka:

1. Otapanje željene komponente u otapalu
2. Prijelaz smjese otopljene tvari i otapala na površinu namirnice
3. Raspršivanje otopljene tvari u otapalu.

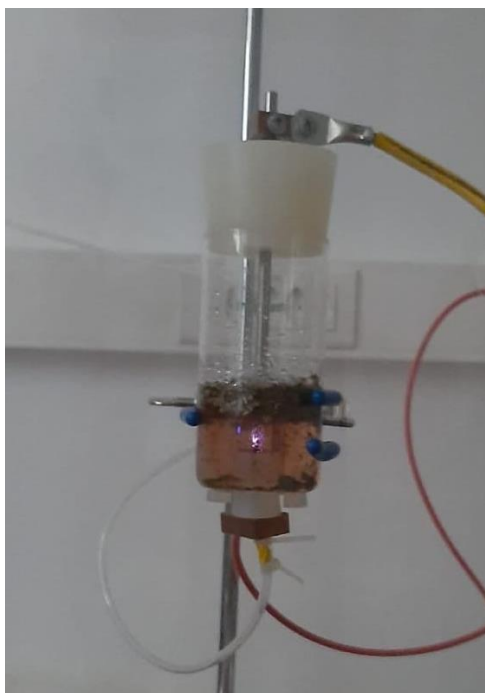
Klasične metode ekstrakcije provode se na povišenim temperaturama kako bi se ubrzao proces jer pri višim temperaturama dolazi do povećanja brzine otapanja tvari. Osim o temperaturi, vrijeme ekstrakcije ovisi i o površini namirnice izložene otapalu, topljivosti komponente u otapalu, volumnom protoku otapala te viskoznosti otapala. Kako bi se povećala površina izložena otapalu, namirnica se prije ekstrakcije usitnjava i homogenizira. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može proći sloj krutih čestica, a povećanjem protoka otapala smanjuje se granični sloj između otapala i površine namirnice te se tako povećava brzina ekstrakcije (Drmić i Režek- Jambrak, 2010). Za ekstrakciju je vrlo važan izbor otapala. Izbor otapala ovisi o svojstvima tvari koja se ekstrahira. Hidrofilni spojevi ekstrahiraju se polarnim otapalima kao što su metanol, etil- acetat ili etanol. Lipofilni spojevi ekstrahiraju se najčešće diklormetanom ili mješavinom diklormetana i metanola u omjeru 1:1 (Sasidharan i sur., 2011). Otapalo ne smije reagirati s ekstraktom, niti se razgrađivati, mora biti sigurno za upotrebu, neškodljivo za okoliš te imati što nižu točku ključanja kako bi se lakše odvojilo od željene komponente. Uz to, otapalo mora biti što jeftinije i dostupno u dovoljnim količinama (Drmić i Režek- Jambrak, 2010).

Klasične metode ekstrakcije su Soxhlet ekstrakcija, maceracija, dekokcija, perkolacija i druge (Azwanida, 2015). Kroz zadnjih 50 godina razvijene su nekonvencionalne metode ekstrakcije koje su manje štetne za okoliš, pružaju bolje iskorištenje procesa ekstrakcije i kvalitetniji ekstrakt te kraće vrijeme ekstrakcije. Kako bi se poboljšala ekstrakcija, razvijaju se inovativne metode kao što su ekstruzija, digestija enzima, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, mikrovalovi, superkritične tekućine, omsko zagrijavanje te visokonaponska električna pražnjenja (Azmir i sur., 2013).

### 2. 3. 1. Visokonaponska pražnjenja električne struje (eng. *High voltage electrical discharges- HVED*)

Tehnologija ekstrakcije bioaktivnih tvari iz biljnih materijala korištenjem HVED- a je netopliniska, ekološki prihvatljiva metoda ekstrakcije koja omogućuje poboljšanu ekstrakciju uz korištenje manje energije u odnosu na druge metode (Xi i sur., 2017; Boussetta i Vorobiev, 2014). HVED u vodi obuhvaća fazu pražnjenja struje i fazu pražnjenja luka. Za vrijeme faze pražnjenja struje u vodi se pojavljuju slabi udarni valovi i mali mjehurići. U toj fazi generira se ultraljubičasto (eng. *Ultraviolet- UV*) zračenje i njegovim djelovanjem nastaju slobodni radikali (Li i sur., 2019). Nastali mjehurići plina postoje u četiri faze: stvaranje, širenje, implozija te kolaps. Svojim kolapsom mjehurići stvaraju sekundarne udarne valove kratkog trajanja. Za vrijeme faze pražnjenja struje ionizirani plinski kanali tvore provodni put za struju. Kada struja dosegne elektrodu uzemljenja nastaje električni luk i započinje druga faza (Boussetta i Vorobiev, 2014). U fazi pražnjenja luka udarni valovi postaju jači te nastaje više mjehurića i dolazi do jačeg UV zračenja (Li i sur., 2019). Pražnjenja uzrokuju sekundarne fenomene kao što su udarni valovi, kavitacijski mjehurići, nastajanje vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), turbulencija i produkcija slobodnih radikala (slika 5). Svi ti fenomeni rezultiraju fragmentacijom čestica i oštećenjima stanične strukture koji omogućuju izlazak unutarstaničnih komponenti iz stanice te na taj način olakšavaju ekstrakciju bioaktivnih komponenti (Barba i sur., 2016; Rajha i sur., 2015).





Slika 5. Prikaz visokonaponskog pražnjenja između dviju elektroda (vlastita fotografija)

Najvažniji faktori za ekstrakciju potpomognutu HVED- om su:

1. Intenzitet električnog polja
2. Brzina protoka
3. Omjer tekućine i krutine
4. Vrijeme obrade
5. Odabir otapala (Li i sur., 2019).

Intenzitet električnog polja utječe na formiranje pražnjenja električne struje i na stvaranje sekundarnih fenomena kao što su UV zračenje, kavitacijski mjehurići te koncentracija slobodnih radikala. Kako bi se osigurali optimalni uvjeti potrebno je osigurati dovoljno jak intenzitet električnog polja kako bi nastalo pražnjenje, ali ne prejak kako ne bi utjecalo na oksidaciju slobodnih radikala. Brzina protoka utječe na tretman HVED- om u kontinuiranim sustavima, budući da u njima mješavina otapala i suhe tvari teče kroz komoru za tretman. U optimalnim uvjetima protoka poboljšava se prijenos mase iz biljnih stanica u otapalo jer dolazi do smanjenja debljine graničnog sloja. U slučaju prebrzog protoka smanjuje se iskorištenje ekstrakcije zbog prekratkog vremena tretiranja. Vrijeme tretmana utječe na broj pulseva električne struje. Dulji tretman omogućuje bolje uništenje i fragmentaciju stanične membrane te na taj način poboljšava iskorištenje ekstrakcije. Ali u slučaju predugog trajanja

tretmana može doći do degradacije spojeva koji se ekstrahiraju. Omjer tekućine i krutine utječe na proces difuzije. Ukoliko je omjer prevelik, višak otapala može uzrokovati smanjenje iskorištenja i povećanje energetske potrošnje. Odabir otapala vrlo je važan jer su neki organski spojevi slabo topljivi u vodi. Prilikom odabira treba uzeti u obzir topljivost spojeva koji se ekstrahiraju kako bi se odabralo optimalno otapalo za ekstrakciju (Li i sur., 2019).

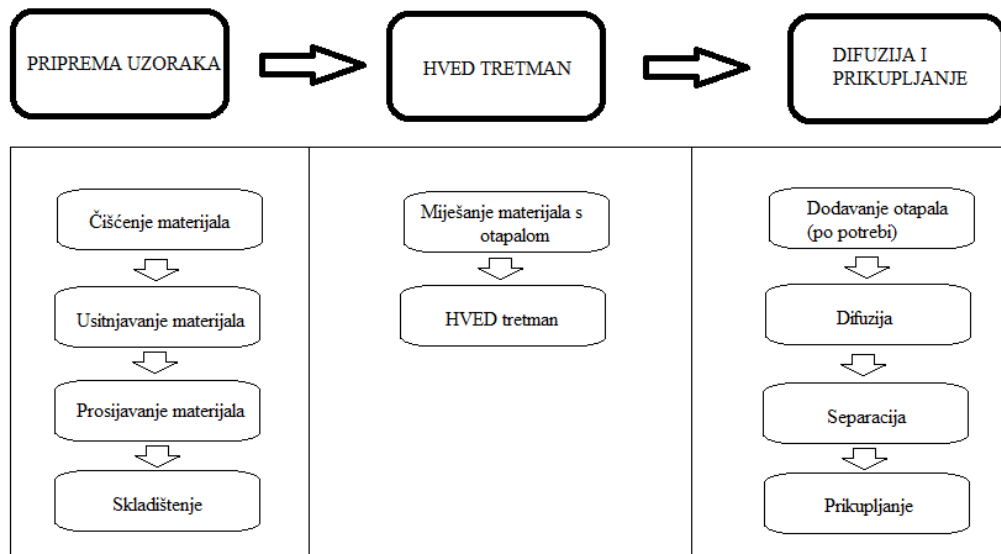
Ekstrakcija potpomognuta HVED- om je tehnologija s velikim potencijalom. U odnosu na konvencionalnu ekstrakciju ima brojne prednosti:

1. Vrlo visoka efikasnost „otvaranja“ stanica i veće iskorištenje ekstrakcije
2. Manji utrošak otapala i veća čistoća ekstrakta
3. Niska temperatura rada koja smanjuje mogućnost degradacije bioaktivnih spojeva.
4. Povećana antioksidativna aktivnost ekstrakta.
5. Kraće vrijeme procesiranja uz manju energetske potrošnju (Li i sur., 2019; Yan i sur., 2018; Xi i sur., 2017).

Unatoč svojim prednostima, HVED ima i svoje nedostatke. Prilikom tretmana nastaju slobodni radikali koji mogu uzrokovati oksidacijsko oštećenje stanica ili oksidirati ciljane spojeve te tako smanjiti iskorištenje ekstrakcije. HVED metoda uz to ima vrlo slabu selektivnost. Može uzrokovati oštećenja na staničnoj membrani i na staničnoj stijenci, što može dovesti do oštećenja na stanici koja uzrokuju ekstrakciju bioaktivnih spojeva koji nisu cilj ekstrakcije koja se provodi. Budući da je jedna od novijih metoda, HVED se tek koristi u laboratorijskim istraživanjima te nije prilagođen industrijskoj proizvodnji. Kako bi se omogućila industrijska upotreba, potrebna su daljnja istraživanja (Li i sur., 2019).

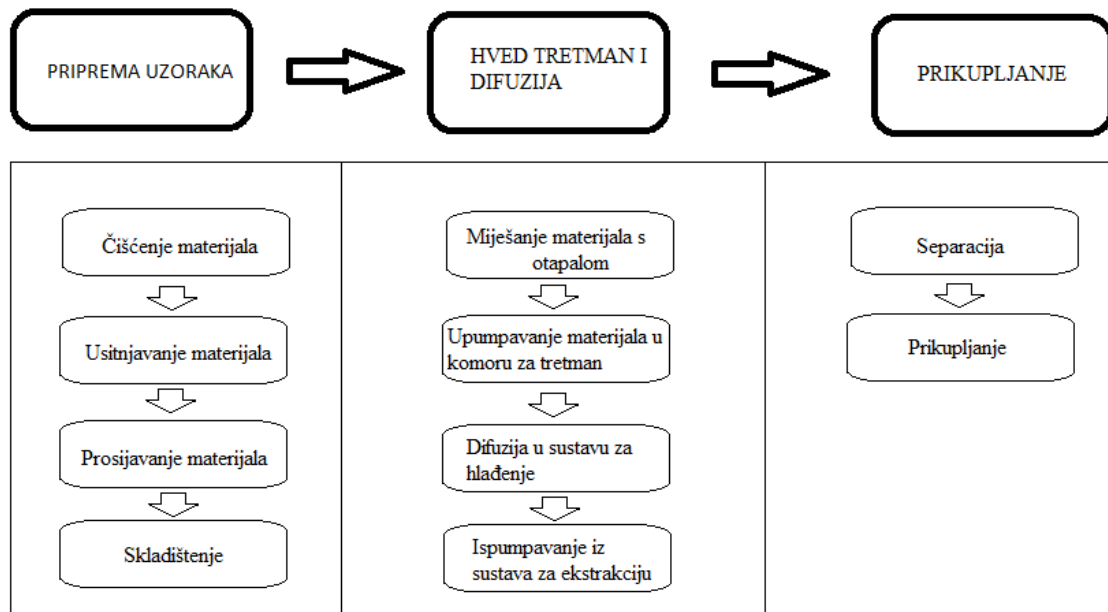
### 2. 3. 2. Uređaji za HVED

Uređaji za HVED mogu biti šaržni, kontinuirani ili uređaji za cirkularnu ekstrakciju. Prilikom korištenja šaržnih uređaja proces se dijeli u tri faze (slika 6). U prvoj fazi odvija se priprema uzoraka, odnosno čišćenje, rezanje i mljevenje. U drugoj fazi provodi se tretman uzoraka HVED- om. Uzorci se stavljaju u otopinu te zatim idu zajedno u komoru za tretman. U komori se nalaze dvije elektrode- elektroda za provođenje električne struje i elektroda uzemljenja. Kada tretman završi, uzorak i otapalo se uklanjaju iz komore i uzimaju za daljnje analize (Li i sur., 2019).



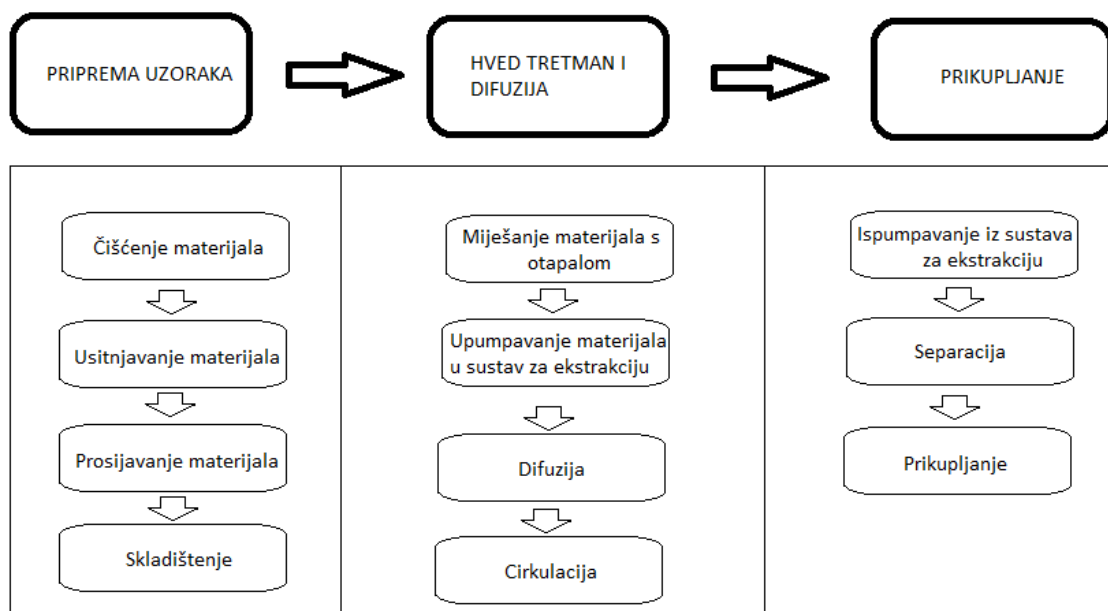
Slika 6. Shematski prikaz šaržne ekstrakcije pomoću HVED- a (Li i sur., 2019)

Kontinuirani sustavi prikladniji su za industrijsku uporabu (slika 7). Kontinuirani sustavi mogu biti sustavi s konvergiranim električnim poljem ili sustavi s prstenastom šupljinom. Sustav s konvergiranim električnim poljem sastoji se od generatora, osciloskopa za prikupljanje podataka, pumpe, komore za tretman, sustava za hlađenje te uređaja za mjerenje napona i jakosti struje. Pripremljeni uzorci u otopini se pomoću pumpe pumpaju u sustav. Najprije se hlade, a zatim ulaze u komoru za HVED tretman. U komori se umjesto klasičnih elektroda nalaze diskovi. Nakon tretmana uzorci se opet hlade, a zatim koriste za daljnje analize. Takvi sustavi imaju mali kapacitet. Sustav s prstenastom šupljinom se razlikuje po tome što koristi prstenaste elektrode umjesto diskova. Tako je između elektroda veći razmak, što omogućuje veći kapacitet uređaja (Li i sur., 2019, Yan i sur., 2018).



Slika 7. Shematski prikaz kontinuirane ekstrakcije pomoću HVED- a (Li i sur., 2019)

Uređaji za cirkularnu ekstrakciju sastoje se od generatora, komore za tretman, spremnika za ekstrakciju i jedinice za transport. Na slici 8 shematski je prikazan takav sustav. Pripremljeni uzorci se tretiraju te zatim transportiraju u spremnik u kojem se odvija difuzija. Nakon ekstrakcije spremnik se otvara te se odvajaju suha tvar i ekstrakt (Li i sur., 2019).



Slika 8. Shematski prikaz cirkularne ekstrakcije pomoću HVED- a (Li i sur., 2019)

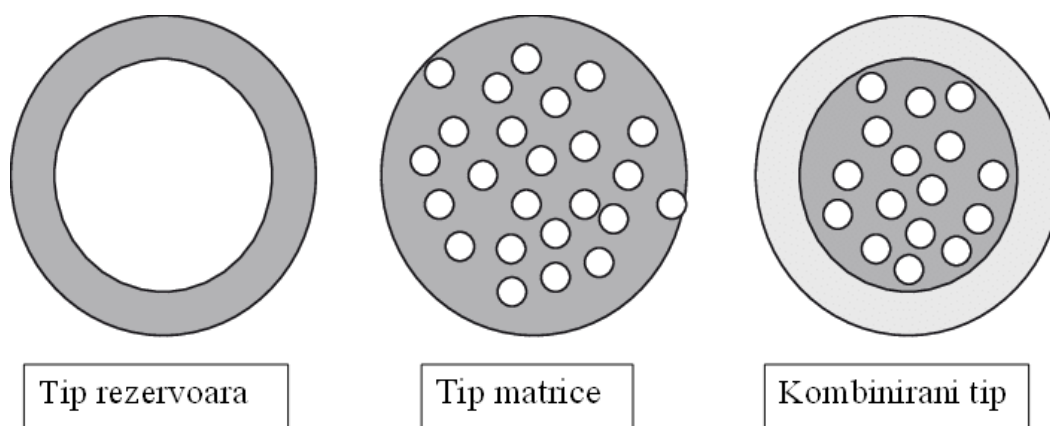
## 2. 4. Inkapsulacija

Inkapsulacija je tehnologija koja omogućuje pakovanje čvrstih, tekućih ili plinovitih materijala u zatvorene kapsule koje ispuštaju sadržaj u određenim uvjetima (Fang i Bhandari, 2010). Može se definirati kao proces kojim se jedna tvar imobilizira unutar druge tvari (Zuidam i Shimoni, 2010). Tvar koja se inkapsulira zove se jezgra, aktivni agens, unutarnja faza ili punjenje, dok je tvar kojom se inkapsulira membrana, ljuska, vanjska faza, omotač, matriks ili premaz (Jurić, 2020; Zuidam i Shimoni, 2010). U prehrambenoj industriji glavni ciljevi inkapsulacije su: zaštita jezgre od degradacija smanjenjem njezine reaktivnosti s okolišem, a samim time i produljenje roka trajanja, smanjenje i kontrola isparavanja i prijelaska mase iz kapsule u okoliš, promjena fizičkih karakteristika materijala koji se inkapsulira kako bi se olakšalo njegovo rukovanje, osiguravanje jednolične disperzije jezgre iz materijala, poboljšanje kvalitete finalnog proizvoda te odvajanje komponenti koje bi bez inkapsulacije međusobno reagirale i prikrivanje neželjenih okusa (Arriola i sur., 2016; Najafi-Soulari i sur., 2016; Fang i Bhandari, 2010). Zbog sporog i kontroliranog otpuštanja spojeva iz kapsula, osigurane su veća efikasnost i sigurnost za okoliš (Jurić, 2020).

Inkapsulacija bioaktivnih materijala uključuje tri koraka:

1. Formiranje stijenke oko materijala koji se inkapsulira
2. Osiguravanje nepropusnost te stijenke
3. Osiguravanje da nepoželjni materijali ne mogu ući u kapsulu (Fang i Bhandari, 2010).

Razlikujemo tri vrste kapsula, a prikazane su na slici 9- tip matrice, tip rezervoara i kombinirani tip. U tipu matrice aktivni agens je dispergiran u vanjskoj fazi. Može biti u homogeniziran ili u obliku kapljica. Često je aktivni agens prisutan i na površini kapsule. U tipu rezervoara aktivni agens okružen je ljuskom. Pod utjecajem dovoljno jakog pritiska, može doći do oštećenja ljuske te propuštanja agensa izvan kapsule. Kapsule mogu biti i multijezgrene, odnosno mogu unutar ljuske imati više odjeljaka s aktivnim agensom. Kombinirani tip kapsule ima svojstva tipa rezervoara i tipa matrice. Kod takvih kapsula aktivni agens je dispergiran u matrici, ali oko matrice postoji i ljuska. Osim prema tipu, kapsule se mogu i razlikovati prema veličini- nanočestice, mikrokapsule, mikrorezervoari itd. (Zuidam i Shimoni, 2010).



Slika 9. Prikaz osnovnih vrsta kapsula (Zuidam i Shimoni, 2010)

#### 2. 4. 1. Metode inkapsulacije

Najčešće korištene metode za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva su: sušenje raspršivanjem, ekstruzija, kokristalizacija, koacervacija, molekularna inkluzija, liposomi, emulzije itd. (Shishir i sur., 2018; Fang i Bhandari, 2010).

Sušenje raspršivanjem je metoda inkapsulacije koja je najraširenija. Koristi se za pripremu aroma te suhих, stabilnih aditiva za hranu. To je kontinuirani proces koji proizvodi kapsule dobre kvalitete te je uz to i ekonomična i fleksibilna metoda (Fang i Bhandari, 2010). Temelji se na atomizaciji tekućine u obliku kapljica u komori za sušenje. Dovodom vrućeg zraka u komoru dolazi do isparavanja vode te formiranja kapsula. Zbog korištenja vrućeg zraka može doći do degradacije bioaktivnih komponenata osjetljivih na toplinu, a samim time i do promjene fizikalnih svojstava inkapsuliranog materijala. Uz to, ova metoda ne omogućuje kontrolu nad veličinom čestica (Shishir i sur., 2018). Najveći nedostatak metode sušenja raspršivanjem je mala količina materijala koji se mogu koristiti za vanjsku fazu jer materijali moraju biti topljivi u vodi do određene razine. Najčešće se koristi maltodekstrin (Fang i Bhandari, 2010).

Koacervacija se temelji na principu odvajanja hidrokoloida i početne otopine te stvaranju koacervacijske faze oko aktivnog spoja koji je suspendiran ili emulgiran u istoj reakcijskoj otopini. Može se ostvariti pomoću jedne koloidne topljive tvari poput želatina ili više topljivih tvari. Koacervacija je skup proces te se u prehrambenoj industriji razmatra samo za visokovrijedne bioaktivne tvari kao što su polifenoli (Fang i Bhandari, 2010).

Sušenje smrzavanjem je metoda koja se koristi za inkapsulaciju materijala osjetljivih na toplinu. Provodi se smrzavanjem materijala te postupnim smanjivanjem pritiska u tri koraka:

smrzavanje, sublimacija i sušenje. Smrzavanje je kratko te se pomoću njega voda prevodi u kruto stanje, odnosno led. Sublimacija podrazumijeva prijelaz vode iz krutog u plinovito stanje. Zatim se provodi zadnji korak u kojem se voda izdvaja iz materijala do željene količine (Fang i Bhandari, 2010). Koristi se za inkapsulaciju tvari topljivih u vodi i prirodnih aroma. Nedostatak ove metode su neujednačeni oblici i veličine dobivenih kapsula. Također, ovom metodom ne poboljšava se stabilnost inkapsuliranih tvari. Budući da se samim sušenjem smrzavanjem ne formiraju kapsule, uz taj proces mora se provoditi dodatna inkapsulacija. Sušenje smrzavanjem je skup postupak koji dugo traje (Shishir i sur., 2018).

Ekstruzija podrazumijeva prolazak otopine biopolimera kroz mlaznicu u otopinu za geliranje. To je metoda koja omogućuje inkapsulaciju širokog spektra materijala, uključujući hidrofobne i hidrofilne spojeve. U laboratorijskim uvjetima metoda ekstruzije uključuje dokapavanje biopolimera u otopinu za geliranje pomoću injekcije. Metodom ekstruzije dobivaju se porozne kapsule velikog promjera. Poroznost kapsula može otežati kontrolu otpuštanja i stabilnosti procesa. Promjer ovisi o promjeru mlaznice, protoku otopine i protoku zraka (Shishir i sur., 2018). Najčešće korišten biopolimer je natrijev alginat. Natrijev alginat je dobar izbor za korištenje zbog jednostavne uporabe, niske cijene, biodegradabilnosti i sposobnosti da formira trodimenzionalne gelove s dvovalentnim kationima (Arriola i sur., 2016). Natrijev alginat je najrasprostranjeniji biopolimer iz morskih izvora i, nakon celuloze, najrasprostranjeniji biopolimer na svijetu. Glavni izvor natrijeva alginata su smeđe morske alge (Rijo i sur., 2014). Natrijev alginat sastoji se od dvije karboksilirane monosaharidne jedinice- manuronska i guluronska kiselina. Njihov omjer određuje svojstva natrijeva alginata. Zbog prisutnosti karboksilnih skupina natrijev alginat je negativno nabijen (Jurić, 2020). U prisustvu dvovalentnih kationa kao što je kalcij, natrijev alginat formira gel zbog interakcija glukuronske kiseline s kalcijevim kationima te tako nastaje vanjski sloj kapsule (Rijo i sur., 2014). Geliranje natrijeva alginata u prisustvu dvovalentnih kationa je proces koji se lako kontrolira i ne zahtijeva zagrijavanje (Zuidam i Shimoni, 2010).

Kokristalizacija je proces inkapsulacije u kojem se saharoza modificira u aglomerirani kristal koji se koristi kao porozna vanjska faza za inkapsulaciju. Kristalizacija saharoze postiže se na temperaturama iznad 120 °C. Ako se prilikom kristalizacije doda drugi sastojak, dodani sastojak se inkorporira u prazne prostore unutar aglomeriranih kristala te se postiže inkapsulacija. Kokristalizacija omogućuje konverziju kapsula iz mokrih u suhe bez ikakvog dodatnog sušenja. Dobiveni proizvodi imaju karakteristike tableta pa su zbog toga od velikog interesa za farmaceutsku industriju i za proizvodnju slatkiša. Glavne prednosti kokristalizacije

su: poboljšana topljivost, hidracija, stabilnost, protočnost, homogenost proizvoda te dobra disperzija (Fang i Bhandari, 2010).

Metoda molekularne inkluzije uključuje korištenje ciklodekstrina kao materijala za inkapsulaciju. Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi derivirani od škroba koji sadrže šest, sedam ili osam glukoernih ostataka te prema tome mogu biti  $\alpha$ -,  $\beta$ - ili  $\gamma$ - ciklodekstrin. Unutarnji dio strukture ciklodekstrina je hidrofoban, dok je vanjski dio strukture hidrofilan te su zbog toga dobar medij za inkapsulaciju manje polarnih molekula kao što su esencijalna ulja (Fang i Bhandari, 2010). Na efikasnost inkapsulacije molekularnom inkluzijom utječu svojstva tvari koja se inkapsulira. Što je tvar manja i hidrofobnija, to ona ima veći afinitet prema ciklodekstrinima (Shishir i sur., 2018). Osim ciklodekstrina, za molekularnu inkluziju može se koristiti i hidrofobno modificirani škrob (Fang i Bhandari, 2010).

Liposomi su koloidalne čestice koje se sastoje od membranskih sustava formiranih od lipidnih dvosloja koji inkapsuliraju prostore s vodom. Budući da imaju i lipidna i vodena svojstva, mogu se koristiti za inkapsulaciju, dostavu te otpuštanje tvari topljivih u vodi, tvari topljivih u lipidima te u amfifilnih tvari. Liposomi nastaju hidrofилnim i hidrofobnim reakcijama između molekula vode i fosfolipida. Velika prednost korištenja fosfolipida je mogućnost otpuštanja inkapsuliranih materijala u željeno vrijeme i na željenom mjestu. Bioaktivni spojevi inkapsulirani u fosfolipidima pokazuju značajne razine apsorpcije u probavnom traktu, a pritom su zaštićeni od probave u želucu (Fang i Bhandari, 2010).

Emulzije se sastoje od dvije tekućine koje se međusobno ne mogu miješati, a pritom je jedna tekućina dispergirana u drugoj u obliku kapljica. Dije se na emulzije ulje u vodi i emulzije voda u ulju. Emulzije ulje u vodi su sustavi koji se sastoje od kapljica ulja dispergiranih u vodi, dok se emulzije voda u ulju sastoje od kapljica vode dispergiranih u ulju (Tadros, 2009). Emulzije se koriste za inkapsulaciju bioaktivnih tvari u vodenim otopinama. Takve kapsule mogu se koristiti u tekućem stanju ili kao prahovi. Za poboljšanje stabilnosti emulzija, u otopine se dodaju emulgatori i modifikatori teksture. Emulzije se mogu koristiti za inkapsulaciju polifenola. Budući da su polifenoli slabo topljivi u vodi, kapsule dobivene korištenjem ove metode sadrže visoku koncentraciju polifenola (Fang i Bhandari, 2010).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3. 1. Materijali

##### 3. 1. 1. Uzorci

Za potrebe izrade ovog rada korišteni su uzorci osušenog i usitnjenog ružmarina (lat. *Rosmarinus officinalis* L.) tvrtke Suban d.o.o. , Samobor. Uzorci su do ekstrakcije skladišteni u polietilenskim vrećicama na suhom i tamnom mjestu.

##### 3. 1. 2. Reagensi

U izradi rada korišteni su sljedeći reagensi:

- deionizirana voda (Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska)
- kalcijev klorid ( $\text{CaCl}_2$ ), (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev alginat ( $\text{NaAlg}$ ), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- zein (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- hidroksipropilmetil celuloza (HPMC), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Folin- Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ), (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- modra galica ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev natrijev tartarat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2, 2'- azinobis (3- etilbenzotiazolin- 6- sulfonska kiselina) reagens (ABTS radikal-kation), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- 6- hidroksi-2, 5, 7, 8- tetrametilkroman- 2- karboksilna kiselina (Trolox), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- 1,1- difenil- 2- pikrilhidrazil (DPPH) radikal (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- citratni pufer (pH= 8,33), (Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska)
- fosfatni pufer (pH= 7,4), (Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska)
- klorovodična kiselina ( $\text{HCl}$ ), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

### 3. 1. 3. Laboratorijski uređaji i posuđe

Laboratorijski uređaji korišteni za izradu ovog rada su:

- HVED generator (IMP- SSPG- 1200, IMPEL, Zagreb, Hrvatska)
- analitička vaga (Precisa 100A- 300M, Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Švicarska)
- magnetska miješalica (MSH- 300, BioSan SIA, Riga, Latvija)
- vorteks (Lab Dancer, IKA, Königswinter, Njemačka)
- magnetska miješalica (MM- 540, Tehnica, Telezniki, Slovenija)
- Büchi inkapsulator (Büchi Encapsulator B- 390, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)
- termostat (ED- 5, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Njemačka)
- spektrofotometar (Shimadzu UV- 1900i, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)
- optički mikroskop (Leica MZ16a stereo- microscope, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Švicarska)
- visokorezolucijski pretražni elektronski mikroskop (JSM- 7000F, Jeol Ltd., Tokyo, Japan)

Korišteno stakleno posuđe: epruvete, menzure (100 mL, 500 mL), čaše (50 mL, 100 mL, 500 mL), kivete, Petrijeva zdjelica, predmetno stakalce, lijevci, kapaljka, stakleni štapić, staklene boce (500 mL, 1000 mL), tikvice.

Ostali pribor: stalak za epruvete, magneti, automatske pipete, pinceta, plastične kivete (10 mL, 50 mL), termometar, špatula, žlice, aluminijska folija, filter papir, cjediljka, plastične boce (1000 mL).

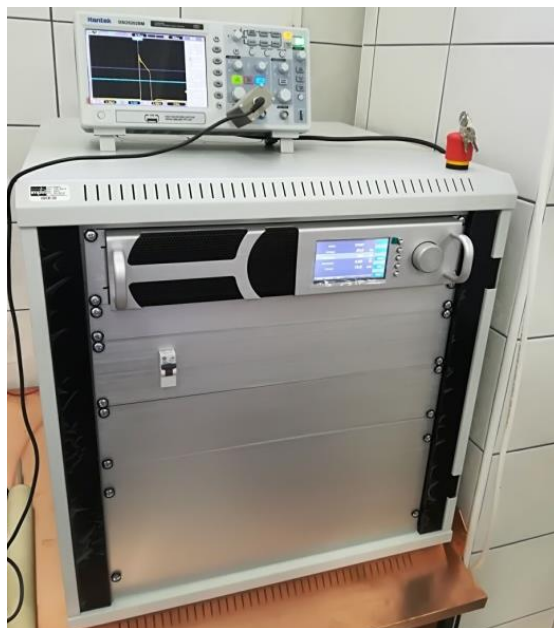
## 3. 2. Metode rada

### 3. 2. 1. Ekstrakcija

Ekstrakcija polifenola provedena je u reaktoru uz HVED koji je generirao generator (prikazan na slici 10). Generator se sastoji od upravljačke jedinice, pretvorbe izmjeničnog napona u visoki istosmjerni napon s pohranom energije, H- bridge pretvarača istosmjernog napona u pravokutne impulse, zaštitne kontrole visokog napona te je elektrodom spojen s reaktorom u kojem se odvija ekstrakcija. U reaktoru se nalazi i elektroda uzemljena.

Nutrizio i sur. su u radu (2020) proveli optimizaciju procesa ekstrakcije polifenola iz ružmarina te su određeni optimalni parametri. Za ekstrakciju su odvagana 2 g ružmarina i prebačena u reaktor zajedno sa 100 mL destilirane vode koja služi kao otapalo. Ekstrakcija

traje 9 minuta, a provodi se uz napon struje 25 kV, frekvenciju 100 Hz, jačinu struje 30 mA uz trajanje pulsa od 0,4  $\mu$ s. Razmak između elektroda je 1,5 cm. Nakon ekstrakcije provodi se filtracija kroz filter papir, a dobiveni ekstrakti zatim se koriste za inkapsulaciju.



Slika 10. HVED generator IMP- SSPG- 1200 (Greenvoltex, 2021)

### 3. 2. 2. Inkapsulacija

Iz dobivenog ekstrakta ružmarina rađene su četiri vrste kapsula pa je ekstrakt podijeljen u četiri boce istog volumena te u petu bocu u koju je dodan  $\text{CaCl}_2$  (2 % m/ V). U prvoj boci otopljen je natrijev alginat (1,5 % m/ V), u drugoj boci otopljeni su natrijev alginat (1,2 % m/ V) i HPMC (0,3 % m/ V), dok su u trećoj boci otopljeni natrijev alginat (1,3 % m/ V) i zein (0,2 % m/ V) te u četvrtoj boci natrijev alginat (1 % m/ V), HPMC (0,3 % m/ V) i zein (0,2 % m/ V). Inkapsulacija je provedena na uređaju Büchi Encapsulator B- 390 koji je prikazan na slici 11 prema parametrima prikazanim u tablici 2. To je poluautomatski uređaj za inkapsulaciju ekstruzijom pomoću kojeg je dokapavana otopina natrijevog alginata, zeina i HPMC- a u otopinu  $\text{CaCl}_2$  na magnetnoj miješalici. Alginat u prisustvu dvovalentnih kalcijevih iona stvara mrežu gela i tako nastaju kapsule s omotačem kalcijeva alginata.

Tablica 2. Parametri inkapsulacije

Tlak (mbar)	30
Frekvencija (Hz)	40
Amplituda	3
Otvor mlaznice (mm)	1
Tlak plina N <sub>2</sub> (bar)	2

Inkapsulacija je za istu otopinu provedena u dvije šarže kako bi se dobile paralele. Dobivene kapsule su zatim ostavljene na miješanje u otopini na magnetskoj miješalici minimalno 30 minuta. Nakon miješanja provedena je filtracija kojom su kapsule odvojene od filtrata. Kapsule su zatim razmazane u tankom sloju i stavljene na sušenje preko noći. Isti postupak proveden je s ostale tri otopine za izradu kapsula.

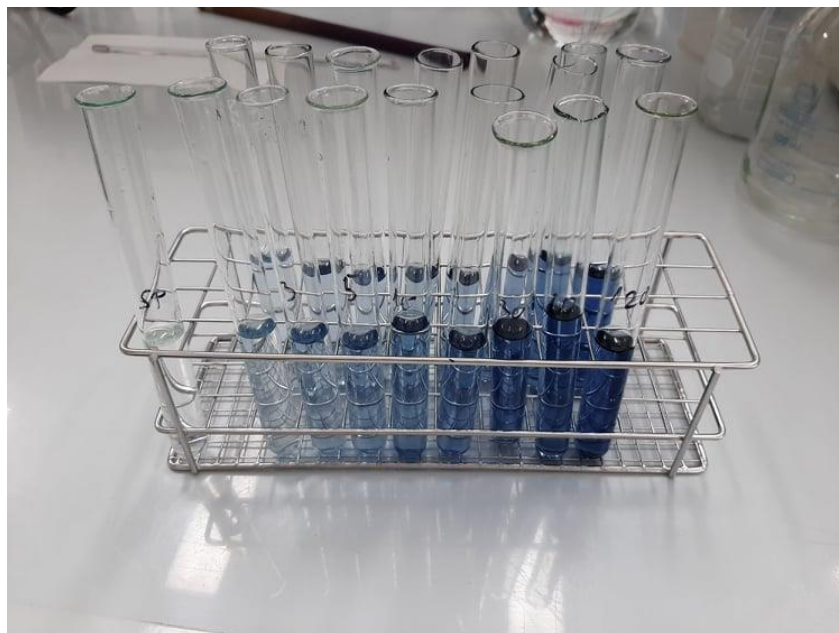


Slika 11. Büchi Encapsulator B- 390 (vlastita fotografija)

### 3. 3. 3. Otpuštanje polifenola iz kapsula

Kako bi se izmjerilo otpuštanje polifenola iz kapsula, izvagano je 0,5 g svake vrste kapsula. Izvagane kapsule stavljene su u čašu s 20 mL deionizirane vode i miješane na magnetskoj miješalici u vremenskom periodu od 2 sata. Nakon 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 i 120 minuta iz čaše su uzeti alikvoti od 100  $\mu$ L. Isti postupak proveden je u 20 mL otopine HCl- a (pH= 1,64) i 30 mL fosfatnog pufera (pH= 7,4) uz održavanje temperature otpuštanja na 37 °C pomoću termostata te razliku da je za otpuštanje u fosfatnom puferu odvagano 0,3 g svake vrste kapsula. Otpuštanjem u otopini HCl-a pri temperaturi 37 °C provedena je simulacija uvjeta u

želucu, a otpuštanjem u fosfatnom puferu pri istoj temperaturi provedena je simulacija uvjeta u tankom crijevu. Otpuštanja su rađena u dvije paralele, a alikvoti su korišteni za određivanje ukupnih polifenola (slika 12).



Slika 12. Uzorci otpuštanja polifenola iz kapsula (vlastita fotografija)

#### 3. 3. 4. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Metoda određivanja ukupnih polifenola (eng. *Total phenolic content- TPC*) temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin- Ciocalteu reagensa s polifenolnim spojevima (reducirajući reagens). Folin- Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline. U reakciji a fenoksid- ionom iz uzorka Folin- Ciocalteu reagens reducira do volframovih i molibdenovih oksida koji su plavo obojeni, a fenoksid- ion oksidira. Intenzitet plavog obojenja proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Ainsworth i Gillespie, 2007).

Baždarni pravac izrađen je pomoću otopina standarda galne kiseline koncentracije  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ . Iz te otopine su u tikvicama od 50 mL pripremljena razrjeđenja: 50, 100, 200, 300, 400, 600 i  $800 \text{ mgL}^{-1}$ . Zatim je u zasebne epruvete otpipetirano 0,1 mL svakog pripremljenog razrjeđenja te su im dodani 7,9 mL destilirane vode, 0,5 mL Folin- Ciocalteu reagensa (razrijeđenog u vodi u omjeru 1: 2) i 1,5 mL 20 %- tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Sadržaj epruveta se zatim dobro promiješa pomoću vortexa i ostavi da stoji 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga se spektrofotometrom mjere apsorbancije nastalog plavog obojenja pri valnoj duljini od 765 nm u odnosu na slijepu probu. Spektrofotometar je prikazan na slici 13. Slijepa proba

priprema se istim postupkom, ali umjesto galne kiseline dodaje se jednak volumen deionizirane vode. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija izradi se baždarni pravac.

Za određivanje udjela ukupnih polifenola u uzorcima ponavlja se gore navedeni postupak, ali se umjesto galne kiseline u epruvete otpipetira 0,1 mL uzorka. Prema jednadžbi baždarnog pravca izračunava se TPC u uzorcima za izmjerene vrijednosti apsorbancija, a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (EGK) ( $\text{mg EGK L}^{-1}$ ).

Osim u uzorcima otpuštanja polifenola, TPC je određivan u filtratima, ekstraktu i u kapsulama s inkapsuliranim ekstraktom. Za određivanje TPC- a u kapsulama odvagano je 0,1 g kapsula te su zatim razbijene snažnim miješanjem u plastičnoj kiveti s 10 mL citratnog pufera. Nakon provedenog razbijanja, iz svakog uzorka razbijenih kapsula uzet je alikvot od 100  $\mu\text{L}$  te je proveden postupak određivanja ukupnih polifenola. Ukupni udio polifenola u kapsulama naziva se kapacitet punjenja (eng. *Loading capacity*- LC). Mjerenja LC- a u kapsulama su rađena u dvije paralele. Omjer otpuštenih polifenola iz kapsula i LC- a kapsula je kumulativno otpuštanje polifenola. Za određivanje TPC- a u filtratima i ekstraktu, uzet je uzorak od 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta i svakog filtrata te je proveden ranije opisan postupak. Mjerenja TPC- a u filtratima i ekstraktu rađena su u tri paralele. Na temelju rezultata izražena je efikasnost inkapsulacije:

$$EE (\%) = \frac{\text{TPC (inkapsulirano)}}{\text{TPC (ekstrakt)}} * 100 \quad /1/$$

Gdje je :

$$\text{TPC (inkapsulirano)} = \text{TPC (ekstrakt)} - \text{TPC (filtrat)} + \text{TPC (ekstrakt)} \quad /2/$$

TPC (inkapsulirano)- udio ukupnih inkapsuliranih polifenola ( $\text{mg EGK L}^{-1}$ )

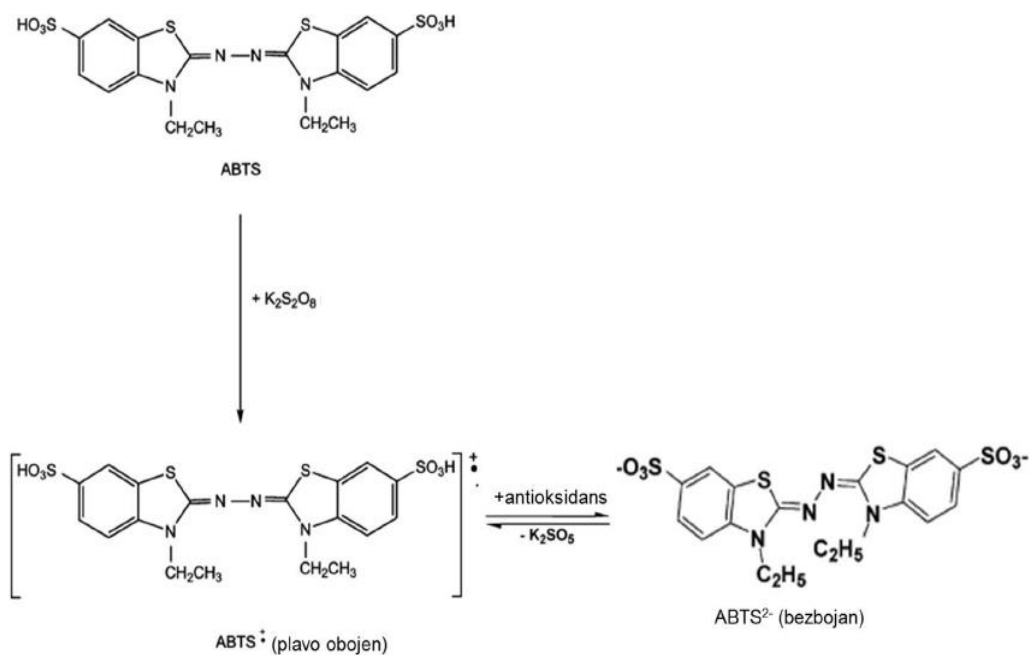
TPC (ekstrakt)- udio ukupnih polifenola u ekstraktu ( $\text{mg EGK L}^{-1}$ )

TPC (filtrat)- udio ukupnih polifenola u filtratu ( $\text{mg EGK L}^{-1}$ )



Slika 13. Shimadzu UV- 1900i spektrofotometar (vlastita fotografija)

3. 3. 5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom  
 ABTS (2, 2'- azinobis (3- etilbenzotiazolin- 6- sulfonska kiselina)) metoda temelji se na oksido- redukcijskoj reakciji „gašenja“ plavo- zelenog ABTS radikal- kationa koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS prije analize (slika 14). Mjerenjem apsorbancije ABTS radikala pri valnoj duljini od 734 nm, određuje se antioksidacijski kapacitet uzorka u odnosu na 6- hidroksi-2, 5, 7, 8- tetrametilkroman- 2- karboksilna kiselina (Trolox- analog vitamin E) u istim uvjetima (Re i sur., 1999).



Slika 14. Mehanizam oksidacije ABTS radikala i reakcija s antioksidansom (Re i sur., 1999)

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa sa 140 mM kalijevim peroksodisulfatom do konačne koncentracije otopine kalijeva peroksidisulfata od 2,45 mM pripremljena je otopina ABTS+ radikala. Pripremljena otopina omotana je aluminijskom folijom i ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina je razrijeđena 96 %- tnim etanolom do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1 %. Alikvot uzorka volumena 40  $\mu$ L zatim je pomiješan s 4 mL otopine ABTS+ radikala u kivetu te je nakon 6 minuta spektrofotometrom izmjerena apsorbanca na 734 nm. Uz uzorke izmjerena je i apsorbanca slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka s 4 mL otopine ABTS+ radikala pomiješa 40  $\mu$ L destilirane vode. Mjerenja su rađena u tri paralele.

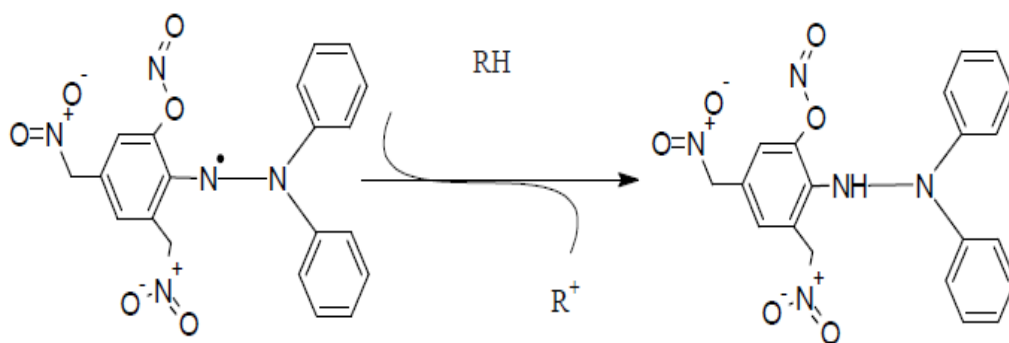
Baždarni pravac priprema se pomoću osnovne otopine standarda Trolox- a koncentracije 1 mM. Iz te otopine u tikvici od 50 mL pripreme se razrjeđenja: 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM i 0,8 mM. Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije s ABTS radikalom, ali se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 40  $\mu$ L pripremljenih razrjeđenja. Baždarni pravac je pravac ovisnosti apsorbanca o koncentraciji koji se izradi na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbanca i poznatih vrijednosti koncentracija razrjeđenja Trolox- a.

Promjena apsorbanca ABTS radikala nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbanca uzorka od apsorbanca slijepe probe. Pomoću baždarnog pravca zatim se preračuna na koncentraciju Troloxa kojom se postiže isti reakcijski učinak (obezbojenje otopine radikala pri istim uvjetima). Rezultati se izražavaju kao mmol L<sup>-1</sup> ekvivalenta Trolox- a (ET).

### 3. 3. 6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Metoda se temelji na redukciji DPPH (1,1- difenil- 2- pikrilhidrazil) radikala u otopini metanola (slika 15). DPPH radikal zbog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra, dok u prisutnosti elektron donora (antioksidans) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu boju (reducirani oblik radikala), što se mjeri promjenom apsorbanca reakcijske smjese u određenom vremenu u odnosu na učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Brand- Williams i sur., 1995).





Slika 15. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom (Brand- Williams i sur., 1995)

Postupak započinje pripremom 0,094 mM otopine 1, 1- difenil- 2- pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolu. U epruvetu se zatim otpipetira 100  $\mu$ L ekstrakta i doda 3,9 mL pripremljene otopine DPPH i vorteksira. Nakon toga reakcijska smjesa stoji u mraku 30 minuta kako bi se postiglo ravnotežno stanje. Nakon 30 minuta mjeri se apsorbancija spektrofotometrom pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na isti način, ali umjesto ekstrakta sadrži metanol.

Baždarni pravac izrađuje se pomoću otopine standarda Trolox- a koncentracije 1 mM. Iz tog standarda u tikvicu od 50 mL pripreme se razrjeđenja: 0, 1 mM, 0, 25 mM, 0, 5 mM i 0, 75 mM. Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije s DPPH radikalom, s time da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 100  $\mu$ L pripremljenih razrjeđenja. Na temelju izmjenjenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox- a izradi se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji.

Promjena apsorbancije DPPH radikala nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe. Koristeći baždarni pravac se preračuna na koncentraciju Trolox- a kojom se postiže isti reakcijski učinak (obezbojenje otopine radikala). Dobiveni rezultati izražavaju se kao mmol L<sup>-1</sup> ekvivalenata Trolox- a (ET). Mjerenja su rađena u tri paralele.

### 3. 3. 7. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry- u

Kako bi se mogla pripremiti reakcijska smjesa, najprije je potrebno pripremiti reagens A, B i C te otopinu Folin- Ciocalteu reagensa. Reagens A se priprema otapanjem (2 % m/ V) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M otopini NaOH. Reagens B je 0,5 %- tna otopina modre galice u 1 %- tnom K, Na- tartaratu. Reagens C priprema se miješanjem 50 mL reagens A i 1 mL reagens B. Folin- Ciocalteu reagens razrjeđuje se destiliranom vodom u omjeru 1: 2. Reakcijska smjesa

priprema se u epruveti. Najprije se dodaje 0,4 mL uzorka, a zatim 2 mL reagensa C te se miješa i ostavi na sobnoj temperaturi 10- 15 minuta. Nakon toga u reakcijsku smjesu se naglo dodaje 0,2 mL Folin- Ciocalteu reagensa uz snažno miješanje (vorteks). Zatim je reakcijsku smjesu potrebno ostaviti na sobnoj temperaturi 40- 60 minuta, a nakon toga se spektrofotometrom mjeri apsorbancija na 740 nm. Apsorbancija se mjeri i slijepoj probi koja se priprema istim postupkom kao i uzorci, osim što umjesto uzoraka u nju dodajemo 0,4 mL destilirane vode.

Za određivanje koncentracije proteina potrebno je i izraditi baždarni dijagram, odnosno dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. Prema ranije navedenom postupku pripreme se uzorci poznatih koncentracija proteina u rasponu od 0,02 do 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. Na temelju izmjerenih apsorbancija za uzorke poznatih koncentracija proteina konstruira se baždarni dijagram te se pomoću njega očita koncentracija proteina u uzorcima nepoznatih koncentracija. Ukupni proteini određivani su u ekstraktu i razbijenim kapsulama. Mjerenja su rađena u dvije paralele.

### 3. 3. 8. Bubrenje kapsula

Metoda određivanja bubrenja kapsula temelji se na mjerenju promjene mase kapsula nakon upijanja vode. Za mjerenje je odvagano 0,1 g kapsula koje su zatim promiješane i ostavljene na 3 sata u 10 mL vode. Nakon 3 sata kapsule su profiltrirane iz vode te prebačene na satno stakalce poznate mase i ponovno izvagane. Mjerenja su rađena u tri paralele. Postotak bubrenja izračunat je prema formuli:

$$\text{Bubrenje (\%)} = \frac{m(\text{kapsule nakon bubrenja}) - m(\text{kapsule prije bubrenja})}{m(\text{kapsule prije bubrenja})} * 100 \quad /3/$$

### 3. 3. 9. Mjerenje promjera kapsula

Mjerenje promjera kapsula provedeno je pomoću optičkog mikroskopa Leica MZ16a stereomicroscope koji je prikazan na slici 16. Mikroskop je povezan s kamerom koja sliku prikazuje na računalu. Od svake vrste kapsula uzet je uzorak od 50 kapsula. Svaki uzorak stavljen je na zasebno predmetno stakalce, a zatim su im pomoću programa Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, verzija E\_LCmicro\_09Okt2009 mjereni promjeri. Na temelju rezultata izražena je srednja vrijednost:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_{(n-2)} + x_{(n-1)} + x_n}{n} \quad /4/$$

Gdje je:

$\bar{x}$ - srednja vrijednost promjera ( $\mu\text{m}$ )

n- broj kapsula



Slika 16. Optički mikroskop Leica MZ16a stereo- microscope (vlastita fotografija)

### 3. 3. 10. Pretražni elektronski mikroskop (eng. *Scanning electron microscopy- SEM*)

Pretražni elektronski mikroskop (SEM) daje nam podatke o topografiji, strukturi kristala, kemijskom sastavu te električnom ponašanju površine uzorka (Vernon-Parry, 2000). Rad SEM- a temelji se na skeniranju površine uzorka precizno fokusiranim snopom elektrona. Taj snop elektrona pobuđuje elektrone u sastavu atoma uzorka. Energija pobuđenih elektrona iz uzorka proporcionalna je energiji elektrona iz snopa. SEM uređaji sastoje se od elektronske kolone koja stvara snop elektrona, komore za uzorke u kojoj dolazi do interakcije između elektrona i uzorka, detektora signala te sustava za stvaranje i gledanje slike (Mršić i Žugaj, 2007). Na vrhu elektronske kolone nalazi se elektronski top koji stvara snop elektrona i ubrzava ga prema uzorku do energije od 0,1- 30 keV. Unutar kolone su elektromagnetske leće koje fokusiraju snop u točku na uzorku veličine 1- 100 nm (Zhou i sur., 2006). Prolaskom kroz elektronsku kolonu, snop elektrona dolazi do komore s uzorkom te zatim uzorku predaju energiju. Nakon toga iz uzorka se emitira energija koja je signal za detektore i omogućuje stvaranje slike (Mršić i Žugaj, 2007).

Stvaranje slike u SEM- u temelji se na prikupljanju signala koji nastaju interakcijom između primarnih elektrona iz snopa elektrona i uzorka (Zhou i sur., 2006). SEM ne konstruira stvarnu sliku uzorka, već konstruira virtualnu sliku iz signala emitiranih iz uzorka. Uređaj elektronskim snopom skenira dijelove uzorka preko kvadratnog predloška na površini uzorka. U svakom trenutku procesa snop elektrona osvjetljava samo jednu točku na predlošku. Pomicanjem snopa od točke do točke stvaraju se signali koji variraju snagom te tako reflektiraju različitosti u uzorku. Izlazni signal je skup podataka koji uređaj zatim pretvara u sliku (Mršić i Žugaj, 2007).

Interakcije između primarnih elektrona i uzorka mogu se dijeliti u dvije kategorije: elastične i neelastične interakcije. Elastične interakcije rezultat su odbijanja primarnih elektrona od elektrona atoma uzorka koji imaju sličnu energiju. Takve interakcije karakterizira gubitak energije prilikom sudara elektrona i velike promjene smjera kretanja elektrona. Elektroni koji se odbijaju pod kutom većim od  $90^\circ$  nazivaju se povratni elektroni te se koriste za stvaranje slike (Zhou i sur., 2006). Imaju visoku energiju (veću od 50 eV) koja rezultira smanjenjem rezolucije slike. Kontrast u slikama dobivenim ovom vrstom signala pojavljuje se zbog različitih atomskih brojeva u određenim atomima uzorka. Atomi s većim atomskim brojem sadrže više pozitivnih naboja pa od sebe odbijaju veći broj elektrona te na slici stvaraju svjetlije površine u odnosu na atome s manjim atomskim brojem koji odbijaju manji broj elektrona te stvaraju tamnije površine na slici. Slike dobivene ovom vrstom signala daju važne informacije o sastavu uzorka (Mršić i Žugaj, 2007). Neelastične interakcije rezultat su prijenosa energije s primarnih elektrona na atom uzorka. Prilikom neelastičnih interakcija nastaju sekundarni elektroni (Zhou i sur., 2006).. Imaju malu energiju (po definiciji manju od 50 eV) te zbog toga mogu iskočiti samo iz plitkog dijela površine uzorka (Mršić i Žugaj, 2007). Sekundarni elektroni su najčešće korišteni signal koji nastaje interakcijom između primarnih elektrona i uzorka. Nastaju ionizacijom atoma uzorka prilikom udara snopa elektrona u površinu uzorka. Zbog ionizacije atoma slabije vezani elektroni u atomu se emitiraju iz atoma uzorka te postaju sekundarni elektroni. Sekundarni elektroni koriste se za vizualizaciju teksture na slikama (Zhou i sur., 2006). Viši dijelovi uzorka (vrhovi) na slici su svjetliji u odnosu na niže dijelove uzorka (doline) koji su na slici tamniji (Mršić i Žugaj, 2007). Uz njih, prilikom neelastičnih interakcija nastaju i rendgenske zrake (X- zrake), Augerovi elektroni te dolazi do pojave katodoluminiscencije (Zhou i sur., 2006). X- zrake nastaju izbijanjem elektrona iz unutarnje ljuske atoma pomoću ubrzanog primarnog elektrona. Izbijeni elektron tada emitira energiju u obliku fotona X- zrake. Emitirana energija

karakteristična je za svaki pobuđeni atom te omogućuje određivanje elemenata prisutnih u uzorku (Mršić i Žugaj, 2007). Augerovi elektroni nastaju ionizacijom atoma prilikom koje elektroni iz vanjske ljuske atoma popunjavaju prazno mjesto nastalo u unutarnjoj ljuski elektrona. U tom procesu dolazi do oslobađanja viška energije. Tu energije prenose Augerovi elektroni. Njihovi signali omogućuju analizu površine uzorka. Katodoluminiscencija je pojava pri kojoj uzorak uslijed interakcije sa snopom elektrona oslobađa energiju u obliku fotona. Ti fotoni mogu imati valne duljine infracrvenog, vidljivog ili ultraljubičastog spektra. Detekcija tih fotona omogućuje analizu uzorka, budući da do te pojave dolazi samo kod nekih materijala (Zhou i sur., 2006). Uz to, zahvaljujući katodoluminiscenciji, moguće je otkriti nedostatke materijala koji degradiraju svojstva zračenja (Vernon-Parry, 2000). U većini slučajeva, prilikom udara snopa elektrona u površinu uzorka, elektroni se ne odbijaju u istom trenu, već ulaze u uzorak prije odbijanja. Tako nastaje područje primarnog uzbuđenja u uzorku te iz njega nastaju brojni signali. Dubina ulaska elektrona u uzorak proporcionalna je u odnosu na energiju snopa te obrnuto proporcionalna u odnosu na visinu atomskog broja atoma u uzorku (Zhou i sur., 2006).

Najveća prednost SEM- a u odnosu na druge mikroskope je njegova rezolucija (Mršić i Žugaj, 2007). Granica rezolucije je minimalna udaljenost između dvije točke između dvije strukture pri kojoj su one vidljive kao dva različita objekta (Zhou i sur., 2006). Osim rezolucije, velika prednost je i dubina polja, odnosno mogućnost dobivanja fokusirane slike objekata različite visine (nije potrebna glatka površina uzorka). S većom dubinom polja mikroskop kvalitetnije prikazuje trodimenzionalne objekte. Kvaliteta slike uređaja velikim djelom dolazi iz njegove dubine polja. Uz to, moguća je i mikroanaliza sastava uzorka (više podataka od same topografije površine) te postizanje velikih povećanja (do 1000000 puta) (Mršić i Žugaj, 2007, Vernon-Parry, 2000).

Za analizu kapsula SEM- om, uzet je uzorak od 10 kapsula za svaku vrstu. Kapsule su analizirane na Institutu Ruđer Bošković. Za analizu je korišten visokorezolucijski pretražni elektronski mikroskop JSM- 7000F, prikazan na slici 17.



Slika 17. Visokorezolucijski pretražni elektronski mikroskop JSM- 7000F (Šestar, 2021)

### 3. 3. 11. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni mjerenjima obrađeni su u programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, SAD). Pomoću programa napravljena je analiza varijance (ANOVA). ANOVA tablice omogućuju utvrđivanje statistički značajnih odstupanja u mjerenjima ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati ovog rada obuhvaćaju kemijsku analizu ekstrakta ružmarina, mjerenja fizikalnih svojstava kapsula, mjerenja kemijskih svojstava kapsula te određivanje otpuštanja polifenolnih spojeva iz četiri vrste kapsula u tri različita medija. U ekstraktu ružmarina mjereni su koncentracija proteina, udio ukupnih polifenola te antioksidacijska aktivnost (ABTS i DPPH metoda). Fizikalna svojstva kapsula koja su mjerena su postotak bubrenja, njihov promjer te je provedena analiza kapsula i njihove površine pomoću SEM- a. Kemijska svojstva kapsula koja su mjerena su kapacitet punjenja (LC), efikasnost inkapsulacije i koncentracija proteina u kapsulama. Otpuštanja polifenola iz kapsula mjerena su u vodi, klorovodičnoj kiselini (HCl) i fosfatnom puferu.

### 4. 1. Kemijska analiza ekstrakta ružmarina

Tablica 3. Rezultati kemijskih analiza ekstrakta ružmarina dobivenog pomoću HVED- a

Koncentracija proteina ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	$8,48 \pm 0,07$
Ukupni polifenoli ( $\text{mg EGK L}^{-1}$ )	$343,48 \pm 4,48$
Antioksidacijska aktivnost ABTS metodom ( $\text{mmol ET L}^{-1}$ )	$1,79 \pm 0,03$
Antioksidacijska aktivnost DPPH metodom ( $\text{mmol ET L}^{-1}$ )	$1,82 \pm 0,01$

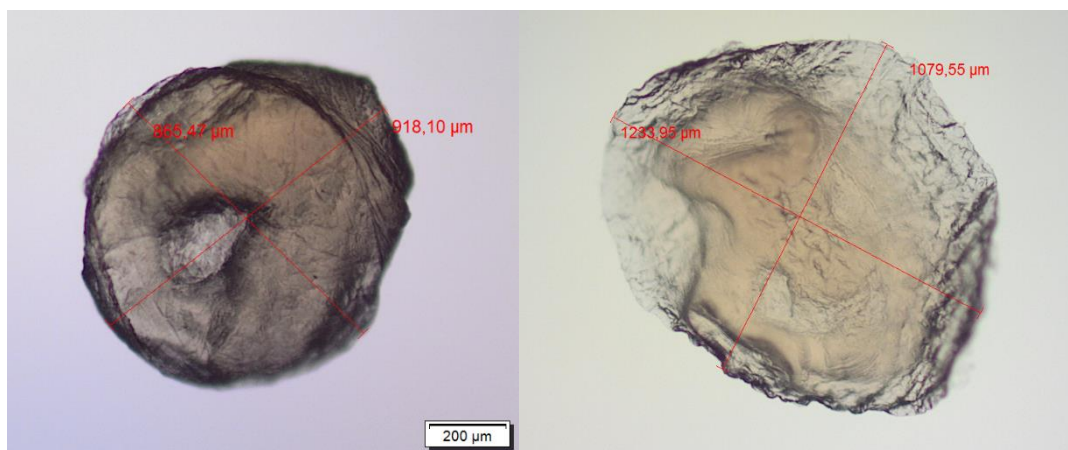
Iz rezultata mjerenja prikazanih u tablici 3 možemo zaključiti da je količina ukupnih polifenola u ekstraktu ružmarina  $343,48 \pm 4,48 \text{ mg mg EGK L}^{-1}$ . Obje metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta daju slične rezultate. ABTS metodom određena antioksidacijska aktivnost ekstrakta iznosi  $1,79 \pm 0,03 \text{ mmol ET L}^{-1}$ , a DPPH metodom izmjerena antioksidacijska aktivnost ekstrakta iznosi  $1,82 \pm 0,01 \text{ mmol ET L}^{-1}$ . Koncentracija proteina u ekstraktu iznosi  $8,48 \pm 0,07 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 4. 2. Fizikalna svojstva kapsula

Tablica 4. Rezultati mjerenja fizikalnih svojstava kapsula

VRSTE KAPSULA	BUBRENJE (%)	PROMJER ( $\mu\text{m}$ )
1,5 % NaAlg	$57,29 \pm 6,03$	$788,24 \pm 113,67$
1,3 % NaAlg, 0,2 % zein	$57,91 \pm 11,35$	$692,30 \pm 76,80$
1,2 % NaAlg, 0,3 % HPMC	$134,68 \pm 14,33$	$1138,85 \pm 269,39$
1 % NaAlg, 0,3 % HPMC, 0,2 % zein	$126,80 \pm 8,10$	$967,16 \pm 217,12$

U tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja promjera kapsula i rezultati mjerenja bubrenja kapsula. Primijećena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između postotaka bubrenja (tablica 6), kapsule koje sadrže HPMC nabubrile su više nego kapsule koje ne sadrže HPMC. Najveće bubrenje u iznosu od  $134,68 \pm 14,33$  % vidljivo je kod kapsula koje sadrže natrijev alginat i HPMC. Sličnu vrijednost bubrenja pokazuju kapsule koje sadrže natrijev alginat, HPMC i zein te ona iznosi  $126,80 \pm 8,10$  %. Najmanje bubrenje u iznosu od  $57,29 \pm 6,03$  % vidljivo je kod kapsula koje sadrže samo natrijev alginat. Slična vrijednost bubrenja izmjerena je i kod kapsula koje sadrže natrijev alginat i zein te ona iznosi  $57,91 \pm 11,35$  %. Veće bubrenje kod kapsula koje sadrže HPMC pripisujemo svojstvima HPMC- a. HPMC je hidrofilna molekula te na sebe veže vodu i zbog toga dolazi do bubrenja (Joshi, 2011). U radu Sai Cheong Wan i sur. (1995) uspoređeno je bubrenje tableta ibuprofena s različitim udjelima HPMC- a te su tablete s većim udjelima HPMC-a pokazale veće bubrenje u odnosu na tablete s manjim udjelima HPMC- a.

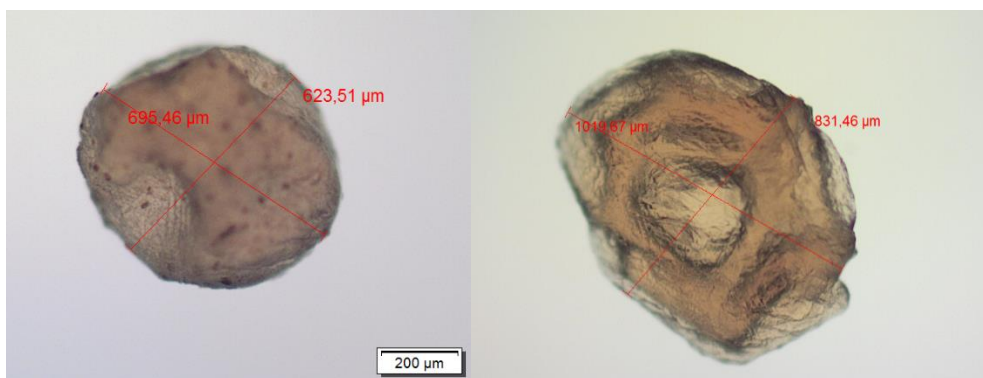


Slika 18. Mjerenje promjera kapsule s 1,5 % NaAlg (lijevo) te 1,2 % NaAlg, 0,3 % HPMC (desno) (vlastita fotografija)

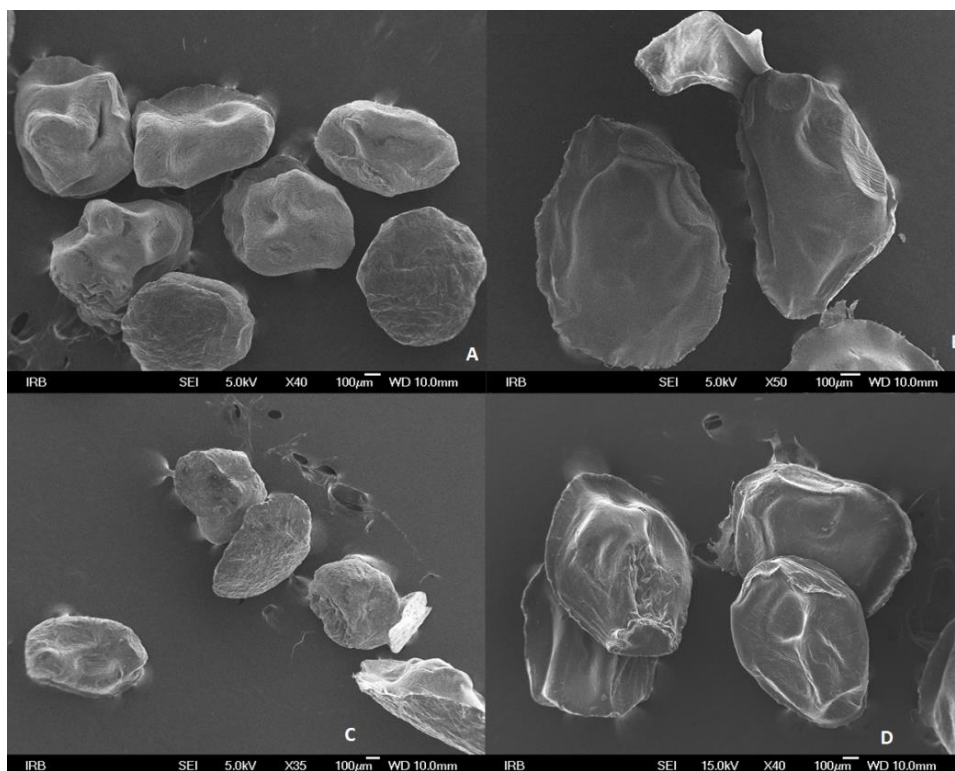
Prema rezultatima mjerenja prikazanim u tablici 4 vidimo da kapsule koje sadrže HPMC imaju u prosjeku veći promjer od kapsula bez HPMC- a. Između promjera navedenih kapsula postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) (tablica 6). Najmanje dobivene kapsule su kapsule koje sadrže natrijev alginat i zein promjera  $692,30 \pm 76,80$  µm (slika 19), a slične vrijednosti izmjerene su kod kapsula koje sadrže samo natrijev alginat-  $788,24 \pm 113,67$  µm (slika 18). Najveće su kapsule koje sadrže natrijev alginat i HPMC promjera  $1138,85 \pm 269,39$  µm (slika 18), a sličan promjer izmjeren je kod kapsula koje sadrže natrijev alginat, HPMC i zein te iznosi  $967,16 \pm 217,12$  µm (slika 19). Za inkapsulaciju je korištena mlaznica promjera 1 mm, te je iz rezultata vidljivo da kapsule koje ne sadrže HPMC imaju manji promjer od



promjera mlaznice. To možemo pripisati sušenju kapsula, budući da sušenjem dolazi do izlaska vode iz kapsula te smanjenja njihovog promjera. Kapsule koje sadrže HPMC zadržale su promjer približan promjeru mlaznice. Razlog tome je bolje vezanje vode na HPMC. Zbog toga prilikom sušenja manje vode napušta kapsule te one zadržavaju promjer. Jurić i sur. su u radu (2019) uspoređivali promjere sušenih i mokrih kapsula. Mokre kapsule imale su veći promjer u odnosu na suhe zbog toga što su suhe izgubile vodu. Iako kapsule s HPMC-om nisu mokre kapsule, zbog hidrofилности HPMC- a na sebe bolje vežu vodu nego kapsule koje ga ne sadrže te ju prilikom sušenja ne gube u tolikoj količini kao kapsule koje ne sadrže HPMC.

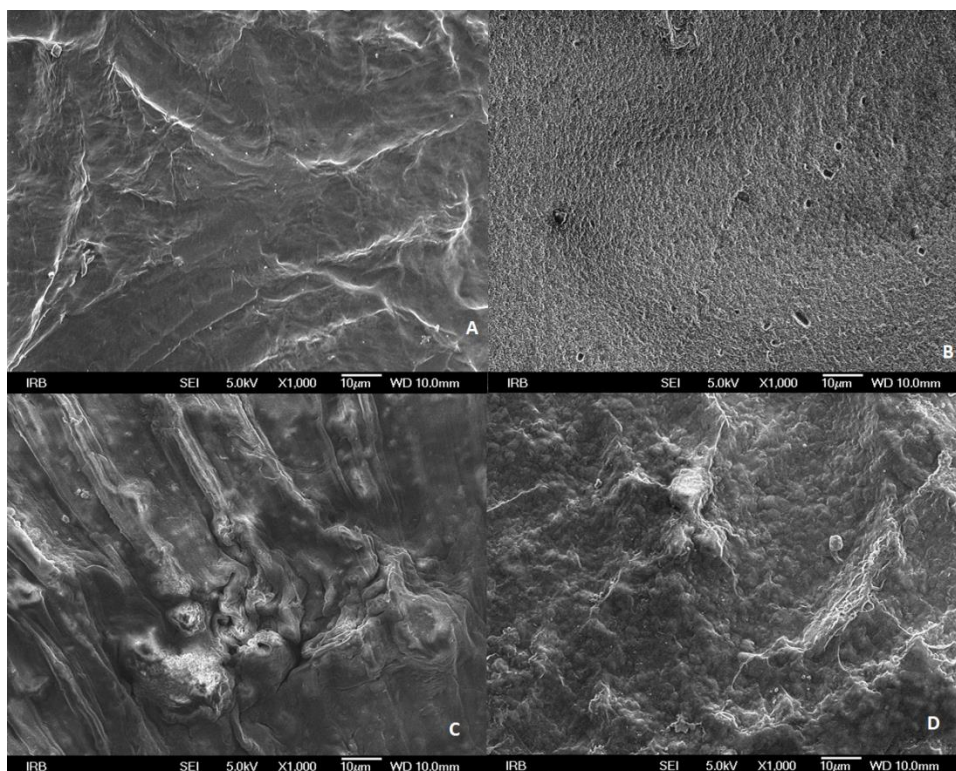


Slika 19. Mjerenje promjera kapsule s 1,3 % NaAlg, 0,2 % zeina (lijevo) te 1 % NaAlg, 0,3 % HPMC, 0,2 % zeina (desno) (vlastita fotografija)



Slika 20. Slike kapsula nastale korištenjem SEM- a: A- kapsule s 1,5 % NaAlg, B- kapsule s 1,2 % NaAlg, 0,3 % HPMC, C- 1,3 % NaAlg, 0,2 % zein, D- 1 % NaAlg, 0,3 % HPMC, 0,2 % zein (vlastita fotografija)

Na slikama kapsula nastalih korištenjem SEM- a, prikazanim na slici 20, vidljivo je da kapsule nisu ovalnog oblika, već na površini imaju udubljenja. Do nestanka ovalnog oblika kapsula došlo je zbog gubitka vode prilikom sušenja. Ti rezultati u skladu su s rezultatima Jurić i sur. (2019). U tom radu uspoređivane su površine suhih i mokrih kapsula. Mokre kapsule zadržale su ovalni oblik za razliku od suhih kapsula koje na kojima su bila vidljiva udubljenja na površini.



Slika 21. Slike površina kapsula nastale korištenjem SEM- a: A- kapsule s 1,5 % NaAlg, B- kapsule s 1,2 % NaAlg, 0,3 % HPMC, C- 1,3 % NaAlg, 0,2 % zein, D- 1 % NaAlg, 0,3 % HPMC, 0,2 % zein (vlastita fotografija)

Na slikama površina kapsula nastalih korištenjem SEM- a, prikazanim na slici 21, vidljivo je da se površine kapsula razlikuju ovisno o njihovom sastavu. Kapsule koje sadrže samo natrijev alginat imaju hrapavu površinu, dok kapsule koje sadrže natrijev alginat i HPMC imaju poroznu i glatku površinu. Vidljivo je i da prisustvo zeina u kapsulama uzrokuje veću naboranost na površini kapsula. Nabori i hrapava površina kapsula nastaju zbog gubitka vode. Jurić i sur. (2019) su u radu uspoređivali površine suhih i mokrih kapsula te su suhe kapsule pokazale naboraniju površinu u odnosu na mokre kapsule.

#### 4. 3. Kemijska svojstva kapsula

Tablica 5. Rezultati mjerenja kemijskih svojstava kapsula- kapacitet punjenja (LC), efikasnost (EE), koncentracija proteina

VRSTA KAPSULA	LC (mg EGK g <sup>-1</sup> )	EE (%)	KONCENTRACIJA PROTEINA (mg mL <sup>-1</sup> )
1,5 % NaAlg	5,55± 0,42	112,73± 1,62	3,32± 0,55
1,3 % NaAlg, 0,2 % zein	10,42± 0,72	111,07± 3,06	12,41± 1,34
1,2 % NaAlg, 0,3 % HPMC	6,74± 0,74	110,62± 2,10	4,84± 1,23
1 % NaAlg, 0,3 % HPMC, 0,2 % zein	9,33± 0,62	117,52± 0,38	10,93± 0,45

Prema rezultatima mjerenja prikazanim u tablici 5 vidljivo je da je najveći LC kapsula koje sadrže natrijev alginat i zein te iznosi 10,42± 0,72 mg EGK g<sup>-1</sup>. Slična koncentracija izmjerena je i kod kapsula koje sadrže natrijev alginat, HPMC i zein u iznosu od 9,33 ± 0,62 mg EGK g<sup>-1</sup>. Najmanji LC izmjeren je u kapsulama koje sadrže samo natrijev alginat te iznosi 5,55± 0,42 mg EGK g<sup>-1</sup>. Slična koncentracija polifenola izmjerena je kod kapsula koje sadrže natrijev alginat i HPMC te iznosi 6,74± 0,74 mg EGK g<sup>-1</sup>. Kapsule koje sadrže zein imaju statistički značajno (p< 0,05) veći LC u odnosu na kapsule koje ne sadrže zein (tablica 6). Papoutsis i sur. su u radu (2018) uspoređivali LC kapsula u koje su dodali protein (sojini proteini) i kapsula u koje nisu dodali protein te se kod kapsula koje su sadržavale protein LC pokazao većim u odnosu na LC kapsula koje nisu sadržavale protein.

U tablici 5 prikazani su rezultati mjerenja efikasnosti inkapsulacije svih vrsta kapsula. Sve kapsule pokazale su približno sličnu efikasnost. Najveća efikasnost inkapsulacije izmjerena je kod kapsula koje sadrže natrijev alginat, HPMC i zein te iznosi 117,52± 0,38 %, dok je najmanja efikasnost inkapsulacije izmjerena kod kapsula koje sadrže natrijev alginat i HPMC te iznosi 110,62± 2,10 %. Efikasnosti veće od 100 % pripisujemo tome da je otopina za inkapsulaciju prilikom inkapsulacije dokapavana u otopinu CaCl<sub>2</sub> u ekstraktu koji sadrži polifenole. Tako su u kapsule dospjeli polifenoli koji omogućuju efikasnost veću od 100 %.

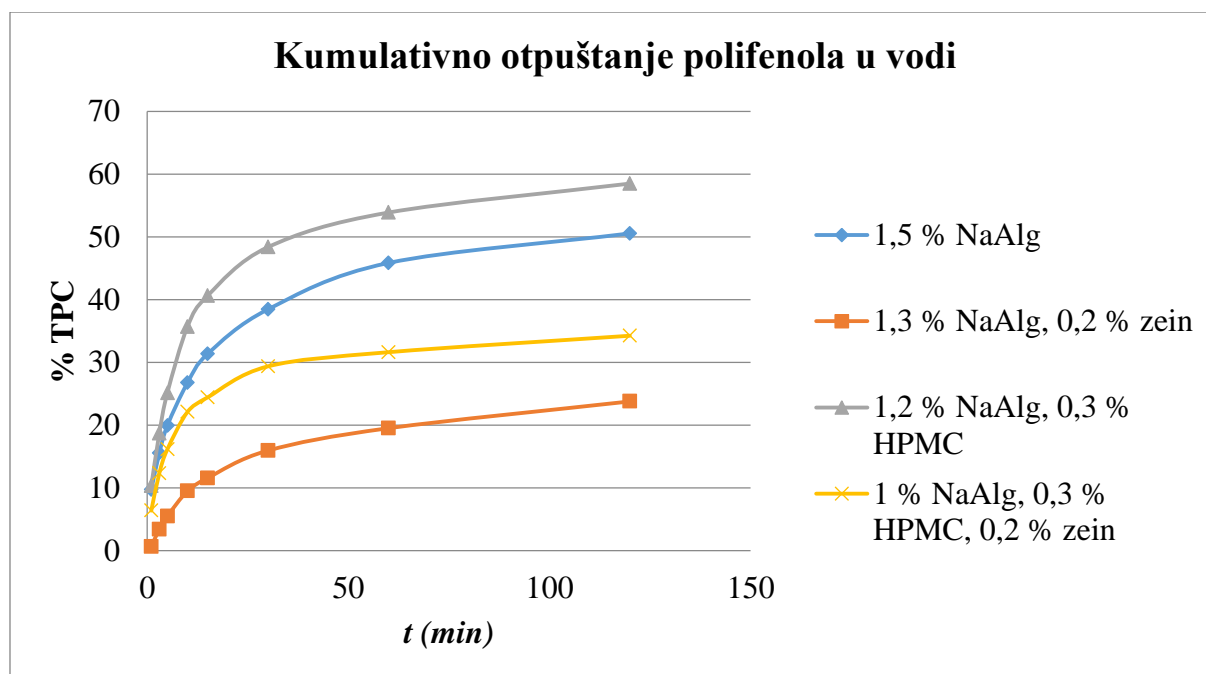
Iz rezultata mjerenja koncentracije proteina u kapsulama prikazanih u tablici 5, možemo zaključiti da kapsule koje sadrže zein imaju statistički značajno (p< 0,05) veći udio proteina u odnosu na kapsule koje ne sadrže zein (tablica 6). Takve rezultate pripisujemo dodatku zeina koji je i sam protein. Najveću koncentraciju proteina pokazuju kapsule koje sadrže natrijev

alginat i zein te ona iznosi  $12,41 \pm 1,34 \text{ mg mL}^{-1}$ . Slična vrijednost koncentracije proteina izmjerena je i kod kapsula koje sadrže natrijev alginat, HPMC i zein te iznosi  $10,93 \pm 0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ . Najmanja koncentracija proteina izmjerena je kod kapsula koje sadrže samo natrijev alginat-  $3,32 \pm 0,55 \text{ mg mL}^{-1}$ . Slična vrijednost koncentracije proteina izmjerena je i kod kapsula koje sadrže natrijev alginat i HPMC te iznosi  $4,84 \pm 1,23 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Tablica 6. Prikaz p- vrijednosti dobivenih statističkom analizom u programu Microsoft Excel 2010

	Promjer	Bubrenje	LC	Udio proteina
p- vrijednost	6,13273E-92	1,57004E-13	7,86347E-15	7,60292E-17

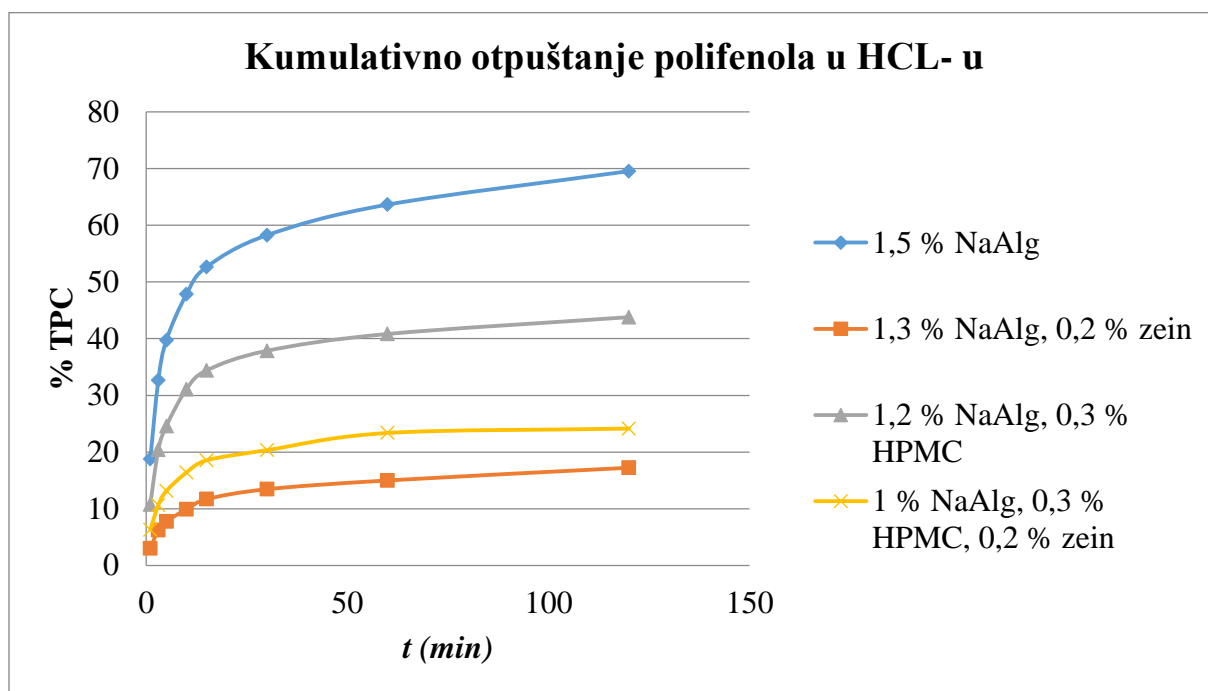
#### 4. 4. Otpuštanje polifenola iz kapsula u različitim medijima



Slika 22. Grafički prikaz kumulativnog otpuštanja polifenola u vodi

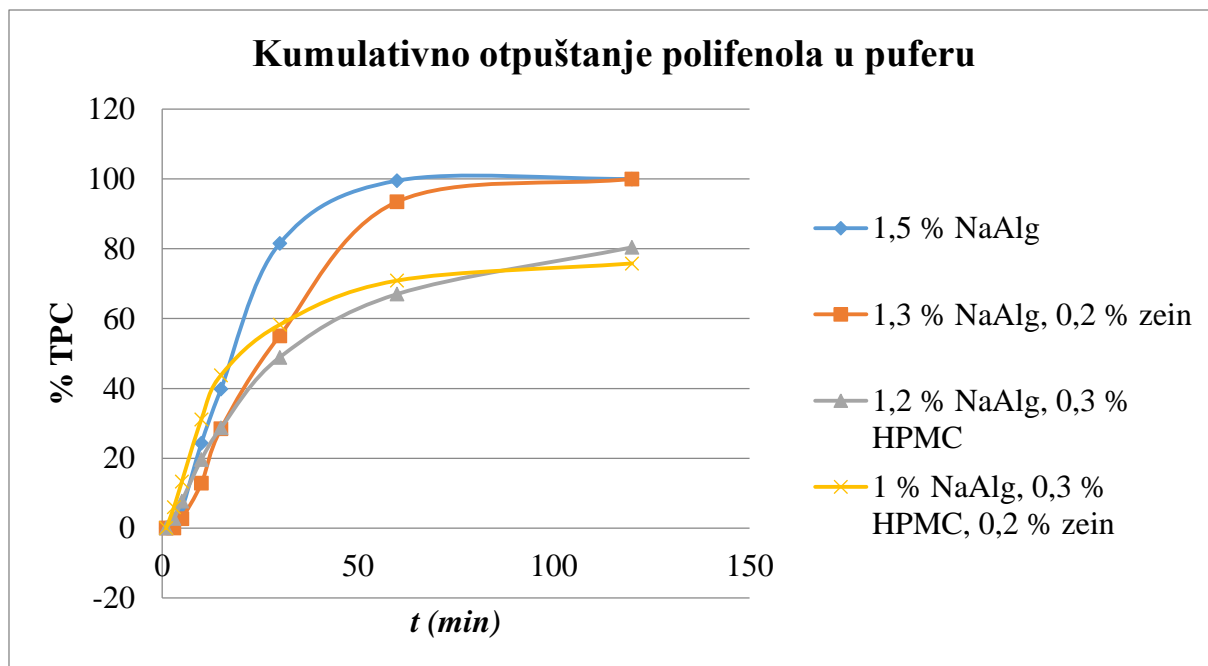
Na slici 22 grafički su prikazani rezultati mjerenja kumulativnog otpuštanja polifenola iz kapsula u vodi. Prema rezultatima je vidljivo da nakon jedne minute kapsule s natrijevim alginatom i HPMC-om otpuštaju najveći udio polifenola (10,33 %), dok kapsule s natrijevim alginatom, HPMC-om i zeinom otpuštaju najmanji udio polifenola (0,66 %). Kod svih kapsula s vremenom je vidljiv porast koncentracije otpuštenih polifenola, a kapsule koje sadrže natrijev alginat i zein s vremenom pokazuju najveći porast koncentracije otpuštenih polifenola- nakon dva sata otpušteno je 58,5 % polifenola. U istom vremenskom periodu kapsule koje su otpustile najmanje polifenola (23,79 %) su kapsule koje sadrže natrijev

alginat i zein. Kod svih vrsta kapsula vidljiv je početni brzi rast koncentracije otpuštenih polifenola koji se smanjuje nakon tridesete minute. Tada koncentracija otpuštenih polifenola sporije raste, odnosno polifenoli se iz kapsula sporije otpuštaju. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da zein u kapsulama uzrokuje usporavanje otpuštanja polifenola u vodi budući da kapsule koje sadrže zein u istom vremenskom periodu otpuštaju manji udio polifenola u odnosu na kapsule koje ga ne sadrže.



Slika 23. Grafički prikaz kumulativnog otpuštanja polifenola u HCl- u

Iz grafičkog prikaza rezultata mjerenja kumulativnog otpuštanja polifenola iz kapsula u HCl- u prikazanog na slici 23, vidljivo je da kod svih vrsta kapsula s vremenom dolazi do povećanja koncentracije otpuštenih polifenola. Najveći porast koncentracije otpuštenih polifenola odvija se u prvih petnaest minuta, a kasnije dolazi do sporijeg otpuštanja. Kapsule koje sadrže samo natrijev alginat kroz vremenski period od dva sata otpuštaju najveći udio otpuštenih polifenola, a to je 69,54 %. Najmanji udio polifenola u istom vremenskom periodu otpuštaju kapsule koje sadrže natrijev alginat i zein- 17,23 %. Prema rezultatima je vidljivo da u odnosu na kapsule koje ne sadrže zein, kapsule koje ga sadrže sporije otpuštaju polifenole u HCl- u. Ovi rezultati se poklapaju s rezultatima rada Karthikeyan i sur. (2012) gdje su uspoređivali otpuštanje iz mikrosfera obloženih zeinom i mikrosfera bez zeina. Dodatak zeina u mikrosfere usporio je otpuštanje u kiselom mediju.



Slika 24. Grafički prikaz kumulativnog otpuštanja polifenola u fosfatnom puferu

Prema rezultatima mjerenja otpuštanja polifenola u fosfatnom puferu, prikazanim na slici 24, vidljiv je porast koncentracije otpuštenih polifenola kroz vremenski period od dva sata kod svih vrsta kapsula. Najveći porast koncentracije otpuštenih polifenola odvija se u prvih petnaest minuta, odnosno tada je najbrže otpuštanje. U tom periodu najveći udio otpuštenih polifenola izmjeren je kod kapsula koje sadrže natrijev alginat, HPMC i zein (43,81 %). Nakon tog perioda brzina otpuštanja polifenola iz te vrste kapsula se smanjuje te nakon dva sata izmjeren udio otpuštenih polifenola iznosi 75,8 %- najmanji udio otpuštenih polifenola iz kapsula u fosfatnom puferu. Kod nijedne vrste kapsula u prvoj minuti nije došlo do otpuštanja polifenola. Kod kapsula koje sadrže natrijev alginat i zein nije došlo do otpuštanja polifenola ni nakon tri minute. Nakon toga dolazi do brzog rasta te je nakon dva sata kod te vrste kapsula izmjereno otpuštanje svih polifenola iz kapsula (100 %). Osim tih kapsula, sve polifenole su otpustile i kapsule koje sadrže samo natrijev alginat. Iz rezultata mjerenja vidljivo je da u fosfatnom puferu, kapsule koje sadrže HPMC sporije otpuštaju polifenole u odnosu na kapsule koje ne sadrže HPMC. Rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim u radu Patole i Pandit (2018). U tom radu proučavano je otpuštanje mesalamina iz kapsula obloženih HPMC-om i kapsula bez HPMC- a te je primijećeno da HPMC usporava otpuštanje u uvjetima simulacije tankog crijeva.

Uspoređujući rezultate mjerenja otpuštanja polifenola u vodi, HCL- u i fosfatnom puferu vidljivo je da svaka vrsta kapsula drugačije reagira u svakoj vrsti otapala. Kapsule koje sadrže

natrijev alginat polifenole najbrže otpuštaju u fosfatnom puferu, dok najsporije otpuštaju u vodi. Kapsule koje sadrže natrijev alginat i zein polifenole najsporije otpuštaju u otopini HCl-a, a najbrže otpuštaju u fosfatnom puferu. Kapsule s natrijevim alginatom i HPMC-om polifenole najbrže otpuštaju u fosfatnom puferu dok najsporije otpuštaju u otopini HCl-a. Kapsule koje sadrže natrijev alginat, HPMC i zein, polifenole najsporije otpuštaju u otopini HCl-a, a najbrže u fosfatnom puferu. Iz svega navedenog, možemo zaključiti da sve vrste kapsula polifenole najbrže otpuštaju u fosfatnom puferu. Otpuštanje u otopini HCl-a predstavlja simulaciju želuca, a otpuštanje u fosfatnom puferu predstavlja simulaciju tankog crijeva te tim medijima najbrže otpuštanje imaju kapsule koje sadrže samo natrijev alginat. Prema tome, vidljivo je da će se dodatkom drugih omotača (HPMC i zein) usporiti otpuštanje polifenola iz kapsula. Tako će većina polifenola zaostati u kapsulama prolaskom kroz želudac te će se otpustiti iz kapsula u tankom crijevu.



## 5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata ovog rada može se zaključiti:

1. Ekstrakcija pomoću HVED-a učinkovita je metoda za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz ružmarina. Dobiveni su ekstrakti koji imaju koncentraciju proteina  $8,48 \pm 0,07$  mg mL<sup>-1</sup> i udio ukupnih polifenola  $343,48 \pm 4,48$  mg EGK L<sup>-1</sup> te antioksidacijsku aktivnost  $1,79 \pm 0,03$  mmol ET L<sup>-1</sup> (ABTS metoda), odnosno  $1,82 \pm 0,01$  mmol ET L<sup>-1</sup> (DPPH metoda).
2. Inkapsulacija ekstruzijom je efikasna metoda za inkapsulaciju polifenolnih spojeva iz ekstrakta ružmarina dobivenog pomoću HVED- a. Efikasnosti svih provedenih inkapsulacija su veće od 100 %.
3. Dodatkom omotača (HPMC i zein) usporava se otpuštanje polifenolnih spojeva iz kapsula u svim medijima, a najbrže otpuštanje je primijećeno prilikom simulacije uvjeta u tankom crijevu. Zbog toga su kapsule koje sadrže oba omotača dobar izbor za inkapsulaciju. Većina polifenolnih spojeva će zaostati u kapsulama prilikom prolaska kroz želudac te će biti u potpunosti ispušteni u tankom crijevu gdje će se apsorbirati u organizam.
4. Budući da kapsule pokazuju sporije otpuštanje polifenolnih spojeva u vodi, mogle bi biti dodatak u proizvodu koji se priprema u vodi i konzumira odmah nakon pripreme. Sušenjem na kapsulama dolazi do gubitka ovalnog oblika i pojave udubljenja, a u vodi kapsule bubre. Korištenjem u proizvodu koji se priprema u vodi, zamaskirale bi se nepoželjne vizualne karakteristike kapsula. Kapsule koje sadrže zein imaju veći LC i udio proteina u odnosu na ostale kapsule te bi se mogle koristiti kao dio punjenja u proteinskim pločicama.

## 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, *Int. J. Food Prop.*, **20**, 1689- 1699. doi:10.1080/10942912.2016.1220393
- Ainsworth, E., A., Gillespie, K., M. (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin- Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.*, **2**, 875- 877.
- Arriola, N. D. A., de Medeiros, P. M., Prudencio, E. S., Müller, C. M. O., Amboni, R. D. M. C. (2016) Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Bioscience* **13**: 32-40.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.*, **117**, 426– 436.
- Azwanida, N. N (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med. Aromat. Plants*, **4**, 196. doi: 10.4172/2167-0412.1000196
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., Orlie, V. (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci. Tech.*, **49**, 96–109.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. U: Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, (Galanakis, C., M., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 3–44.
- Boussetta N, Vorobiev E (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Cr. Chim.*, **17**, 197- 203.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Sci. and Tech.*, **28**, 25- 30, doi: 10.1016/s0023-6438(95)80008-5
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Brit. Med. Bull.*, **49**, 481–493.

- De Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., de Oliveira, L. D. (2019) *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J. Biomed. Sci.*, **26**, 5, doi: 10.1186/s12929-019-0499-8
- Dragović- Uzelac, V. (2019) Predavanja iz kolegija Začinsko i aromatsko bilje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology*, **2**, 22- 33.
- Fang, Z., Bhandari, B (2010), Encapsulation of polyphenols- a review. *Trends Food Sci. Tech.*, **21**, 510- 523
- Greenvoltex (2021) projekt Hrvatske zaklade za znanost, <<http://greenvoltex.pbf.hr/uredaj-za-visokonaponsko-praznjenje-plazma-high-voltage-electrical-discharge-plasma-device/>>.  
Pristupljeno 6. kolovoza 2021.
- Joshi, S. C. (2011) Sol-gel behaviour of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in ionic media including drug release, *Materials*, **4**, 1861- 1905
- Jurić, S. (2020) Bioinkapsulacija kao održiva isporuka aktivnih agensa za ishranu/zaštitu bilja i proizvodnju funkcionalne hrane (doktorska disertacija), Prehrambeno- biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., Bedek, M., Vinceković, M. (2019) Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores, *J. Integr. Agr.*, **18**, 2534- 2548.
- Karthikeyan, K., Lakra, R., Rajaram, R., Korrapati, P. (2012) Development and characterization of zein- based micro carrier system for sustained delivery of aceclofenac sodium, *AAPS PharmSciTech*, **13**, 143- 149, doi: 10.1208/s12249-011-9731-x
- Krešić, V. (2017) Adsorpcija polifenolnih spojeva iz jabuke na  $\beta$ -glukanu (diplomski rad), Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek
- Li, Z., Fan, Y., Xi, J. (2019) Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chem.*, **277**, 246– 260.

- Martens, S., Mithöfer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, **66**, 2399–2407.
- Mena, P., Cirlini, M., Tassotti, M., Herrlinger, K. A., Dall’Asta, C., Del Rio, D. (2016) Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. *Molecules*, **21**, 1576. doi: 10.3390/molecules21111576
- Mršić, G., Žugaj, S. (2007) Analiza GSR čestica upotrebom elektronskog mikroskopa, *Polic. Sigur.*, **3**, 179- 200
- Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., Kadivar M. (2016) Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *J. Biomat. Sci-Polym. E.*, **27**, 1631-1644.
- Nieto, G., Ros, G., Castillo, J. (2018) Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, **5**, 98, doi: 10.3390/medicines5030098
- Nutrizio, M., Gajdoš Kljusurić, J., Marijanović, Z., Dubrović, I., Viskiće, M., Mikolaj, E., Chemat, F., Režek Jambrak, A. (2020) The potential of High voltage discharges for green solvent extraction of bioactive compounds and aromas from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)- computational simulation and experimental methods, *Molecules*, **25**, 3711
- Papoutsis, K., Golding, J. B., Vuong, Q., Pristijono, P., Stathopoulos, C. E., Scarlett, C. J., Bowyer, M. (2018) Encapsulation of citrus by- product extracts by spray- drying and freeze-drying using combinations of maltodextrin with soybean protein and ι- carrageenan, *Foods*, **7**, 115, doi: 10.3390/foods7070115
- Patole, V. C., Pandit, A. P. (2018) Mesalamine- loaded alginate microspheres filled in enteric coated HPMC capsules for local treatment of ulcerative colitis: *in vitro* and *in vivo* characterization, *J. Pharm. Investig.*, **48**, 257- 267, doi: 10.1007/s40005-017-0304-1
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., Vorobiev, E. (2015) Electrical, mechanical, and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenol extraction from vine shoots. *Innov. Food Sci. Emer.*, **31**, 60– 66.
- 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 Radic. Bio. Med.*, **26**, 1231- 1237, doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

- Rijo, P., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., Reis, C. (2014) Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology, *Measurement*, **58**, 249- 255
- Sai Cheong Wan, L., Wan Sia Heng, P., Fun Wong, L. (1995) Matrix swelling: A simple model describing extent of swelling of HPMC matrices, *Int. J. Pharm.*, **116**, 159- 168, doi: 10.1016/0378-5173(94)00285-d
- Santos- Sanchez, N. F., Salas- Coronado, R., Villanueva- Canongo, C., Hernandez- Carlos, B. (2019) Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism, U: Antioxidants (Shalaby, E. ured.) 5. izd., IntechOpen, London, str. 23- 50
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., Latha, L. (2011) Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *Afr. J. Tradit. Complem.*, **8**, 1- 10.
- Sasikumar, B. (2012) Rosemary. U: Handbook of Herbs and Spices, (Peter, K. V. ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 452– 468.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. (2018) Advances in micro and nanoencapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci. Tech.*, **78**, 34– 60.
- Šestár- baza podataka instrumenata za znanstvena istraživanja (2021) <[https://sestar.irb.hr/instrumenti\\_show.php?ID=14&page=5](https://sestar.irb.hr/instrumenti_show.php?ID=14&page=5)>. Pristupljeno 26. Kolovoza 2021.
- Tadros, T. F. (2009) Emulsion science and technology: A general introduction, U: Emulsion science and technology, (Tadros, T. F. ured.), Wiley- VCH, Weinheim, str. 1- 156
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246.
- Vernon-Parry, K. D. (2000) Scanning electron microscopy: an introduction, *III-Vs Review*, **13**, 40–44. doi: 10.1016/s0961-1290(00)80006-x
- Xi, J., He, L., Yan, L. G. (2017) Continuous extraction of phenolic compounds from pomegranate peel using high voltage electrical discharge. *Food Chem.*, **230**, 354- 361, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.072

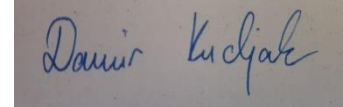
Yan, L. G., Deng, Y., Ju, T., Wu, K. Xi, J. (2018) Continuous high voltage electrical discharge extraction of flavonoids from peanut shells based on “annular gap type” treatment chamber, *Food Chem.*, **256**, 350- 357, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.129

Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., Joy, D. (2006) *Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)*, U: Scanning Microscopy for Nanotechnology (Zhou, W., Wang, Z., L. ured.) Springer, New York, str. 1–40, doi: 10.1007/978-0-387-39620-0\_1

Zuidam, N. J., Shimoni, E. (2010) Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them, U: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. (Zuidam, N., J., Nedović, V. A. ured.), Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, str. 3- 29

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature appears to read "Damir Kudjak".

---

Ime i prezime studenta