

# Utjecaj koncentracije i sastava nosača na inkapsulacijsku učinkovitost ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) ionskim geliranjem

---

Šišić, Gabriјela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:310204>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Gabrijela Šišić**

6873/PT

**UTJECAJ KONCENTRACIJE I SASTAVA NOSAČA NA  
INKAPSULACIJSKU UČINKOVITOST EKSTRAKTA  
RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.) IONSKIM  
GELIRANJEM**

**ZAVRŠNI RAD**

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

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

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ KONCENTRACIJE I SASTAVA NOSAČA NA INKAPSULACIJSKU UČINKOVITOST EKSTRAKTA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.) IONSKIM GELIRANJEM

*Gabrijela Šišić, 0058204568*

**Sažetak:** Zbog izrazite nestabilnosti i osjetljivosti biološki aktivnih spojeva pri uvjetima prerade i proizvodnje prehrambenih proizvoda, te niske biodostupnosti nakon konzumacije, razvijena je tehnika inkapsulacije. Cilj ovoga rada je ispitati utjecaj koncentracije alginata (4% i 5%) i sastava različitih nosača na inkapsulacijsku učinkovitost ekstrakta ružmarina primjenom ionskog geliranja. Kao osnovni nosač za inkapsulaciju polifenola ružmarina korišten je alginat (A) te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke (IPS) i zelenom kavom (ZK) kao novim materijalom u sustavu nosača za inkapsulaciju aktivnih spojeva. Formuliranim hidrogel česticama određene su fizikalno-kemijske i morfološke karakteristike, učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta te profili otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim fluidima. Veća koncentracija alginata (5%) rezultirala je većim česticama sferičnog oblika te tvrđe i elastičnije teksture. „Jačanje“ alginatnog gela s IPS i ZK pokazalo je povećanu inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola i hidrosicimetnih kiselina te stupanj zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, kao i korištenje manje koncentracije alginata (4%) prilikom formulacije alginatnih sustava. Najveću inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola imao je sustav A-ZK za obje korištene koncentracije alginata (93,91% - 4%; 92,07% - 5%), kao i najveću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom. Najbolji profil otpuštanja svih ispitivanih parametara također je pokazao sustav A-ZK i time pokazao velik potencijal primjene zelene kave kao materijala u sustavu nosača za imobilizaciju biljnih polifenola.

**Ključne riječi:** *alginat, inkapsulacija, izolati proteina sirutke, polifenoli, ružmarin, zelena kava*

**Rad sadrži:** 47 stranica, 12 slika, 6 tablica, 73 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Datum obrane:** rujan, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

### **THE INFLUENCE OF CONCENTRATION AND COMPOSITION OF DELIVERY SYSTEMS ON ENCAPSULATION EFFICIENCY OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) EXTRACT USING IONIC GELATION**

***Gabrijela Šišić, 0058204568***

**Abstract:** Due to the high instability and sensitivity of bioactive compounds at the conditions of processing and production of food products, and low bioavailability after consumption, encapsulation technique was developed. The aim of this study is to investigate the influence of alginate concentration (4% and 5%) and composition of different delivery systems on encapsulation efficiency of rosemary extract using ionic gelation. Alginate (A) is used as a basic delivery system for encapsulation of rosemary polyphenols, and it is combined with whey protein isolates (WPI) and green coffee (GC) which is a new material for encapsulation of active compounds. Obtained hydrogel beads were investigated for physical-chemical and morphological properties, encapsulation efficiency of polyphenols and retained antioxidant capacity, as well as for release profiles of polyphenols and antioxidant capacity from hydrogel beads in simulated gastrointestinal fluids. Higher alginate concentration (5%) resulted in formation of bigger beads with more spherical shape, and harder and more elastic texture. Reinforcement of alginate gel with WPI and GC showed increased encapsulation efficiency of total polyphenols and hydroxycinnamic acids and retained antioxidant capacity, where the highest encapsulation efficiency of total polyphenols showed delivery system A-GC for both used alginate concentrations (93,91% - 4%; 92,07% - 5%), as well as the highest retention of antioxidant capacity using ABTS method. The best release profile of all tested parameters was also determined in system A-GC, thus showing a great potential of green coffee as a material in delivery systems for immobilization of plant polyphenols.

**Keywords:** *alginate, encapsulation, green coffee, polyphenols, rosemary, whey protein isolates*

**Thesis contains:** 47 pages, 12 figures, 6 tables, 73 references

**Original in:** Croatian

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

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

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

**Defence date:** September, 2017.

## Sadržaj:

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....  | 2  |
| 2.1. Inkapsulacija.....  | 2  |
| 2.1.1. Primjena tehnike inkapsulacije u prehrambenoj industriji .....  | 3  |
| 2.1.2. Metode inkapsulacije .....  | 5  |
| 2.1.2.1. Ionsko geliranje .....  | 5  |
| 2.2. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari .....  | 6  |
| 2.2.1. Proteini kao nosači za inkapsulaciju.....   | 7  |
| 2.2.2. Polisaharidi kao nosači za inkapsulaciju .....  | 9  |
| 2.2.3. Lipidi kao nosači za inkapsulaciju .....  | 11 |
| 2.2.4. Sintetski materijali kao nosači za inkapsulaciju .....  | 12 |
| 2.3. Ružmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....   | 13 |
| 2.3.1. Bioaktivni sastav ružmarina .....   | 13 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....  | 14 |
| 3.1. Materijal .....   | 14 |
| 3.1.1. Uzorci.....   | 14 |
| 3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta ružmarina .....   | 14 |
| 3.1.2. Kemikalije.....   | 14 |
| 3.1.2. Aparatura i pribor .....  | 15 |
| 3.2. Metode.....   | 17 |
| 3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....   | 17 |
| 3.2.2. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina .....  | 18 |
| 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....  | 19 |
| 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....   | 20 |
| 3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina u sustave nosača na bazi alginata .....                | 21 |
| 3.2.6. Karakterizacija čestica s inkapsuliranim polifenolima ružmarina.....                                  | 22 |
| 3.2.6.1. Određivanje udjela vode .....   | 22 |
| 3.2.6.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika hidrogel čestica .....                          | 23 |
| 3.2.6.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica.....   | 23 |
| 3.2.6.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ..... | 24 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.6.5. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima ..... | 25        |
| 3.2.6.6. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom .....   | 26        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>   | <b>27</b> |
| 4.1. Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.....  | 28        |
| 4.2. Fizikalne i morfološke karakteristike hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.....                             | 29        |
| 4.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina .....                                      | 31        |
| 4.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta .....                           | 32        |
| 4.5. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina .....   | 35        |
| 4.6. Usporedba povećanja mase liofiliziranih čestica nakon vezanja vode .....  | 39        |
| <b>5. ZAKLJUČCI .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>   | <b>41</b> |

## 1. UVOD

Biološki aktivni spojevi posljednjih godina imaju sve veću zdravstvenu i terapijsku primjenu, zbog čega je i razvoj funkcionalnih prehrambenih, farmaceutskih te kozmetičkih proizvoda u stalnom porastu. Zahvaljujući interesu javnosti i zahtjevima potrošača za hranom koja doprinosi poboljšanju zdravlja, odnosno nutraceuticima (Wildman, 2001), sektor proizvodnje funkcionalne hrane postao je jedan od najbrže rastućih sektora prehrambene industrije (Mollet i Lacroix, 2007). Funkcionalni proizvodi obogaćuju se najviše antioksidansima i biljnim ekstraktima te  $\omega$ -3 masnim kiselinama, vitaminima, mineralnim tvarima, prebioticima, probioticima i prehrambenim vlaknima. S obzirom na izrazitu nestabilnost i osjetljivost biološki aktivnih spojeva pri uvjetima prerade i proizvodnje prehrambenih proizvoda, te nisku biodostupnost nakon konzumacije, razvijena je tehnika inkapsulacije s ciljem poboljšanja njihovih funkcionalnih svojstava i povećanja stabilnosti u različitim uvjetima. Postoji veliki broj metoda inkapsulacije, međutim u proizvodnji funkcionalne hrane najviše se koriste metode ionskog geliranja i koacervacije (Smith i Charter, 2010). Materijali koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju moraju biti prirodni, biorazgradivi te sposobni izgraditi barijeru između jezgre materijala (aktivne tvari, punjenja) i njezine okoline. Najčešće se koriste nosači sastavljeni od različitih polimernih materijala (Peppas i sur., 2000). Od prirodnih polimera najviše se koristi alginat zbog jednostavne primjene, biokompatibilnosti i niske cijene (Goh i sur., 2012). Međutim, nedostatak kod primjene alginata kao nosača za inkapsulaciju jest poroznost alginatnog gela, zbog čega je otežano zadržavanje aktivnih spojeva unutar takvog nosača, stoga se alginat često kombinira s drugim prirodnim materijalima poput proteina (Augustin, 2003).

Cilj ovog rada je odrediti utjecaj koncentracije i sastava različitih sustava nosača na inkapsulaciju polifenolnih spojeva ekstrakta ružmarina primjenom ionskog geliranja. Kao osnovni nosač za inkapsulaciju polifenolnih spojeva ružmarina koristit će se alginat u različitim koncentracijama od 4% i 5%, dok će se zbog smanjenja poroznosti alginatnog hidrogela te povećanja inkapsulacijske učinkovitosti alginat kombinirati s izolatima proteina sirutke te zelenom kavom, kao novim materijalom u sustavu nosača za inkapsulaciju. Dobivenim hidrogel česticama s inkapsuliranim polifenolima ružmarina odredit će se fizikalno-kemijske (udjel vode, veličina, parametri teksture) te morfološke karakteristike (izgled čestica). Također, ispitat će se učinkovitost inkapsulacije polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u različitim sustavima nosača te profil otpuštanja ukupnih polifenola, hidroskimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Inkapsulacija

S obzirom na visoku nestabilnost biološki aktivnih spojeva pri uvjetima prerade i proizvodnje prehrambenih proizvoda, kao i njihovu nisku biodostupnost nakon konzumacije, te obzirom na sve veći broj zahtjeva potrošača za funkcionalnim prehrambenim proizvodima, u posljednjih nekoliko godina razvijena je tehnika inkapsulacije. Kao proces imobilizacije aktivnih komponenata u kapsule, inkapsulacija predstavlja jedan od praktičnih načina ostvarivanja takvih zahtjeva. Inkapsulacija se može definirati kao tehnika „pakiranja“ čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala u male kapsule (promjera 1-1000  $\mu\text{m}$ ) koje otpuštaju inkapsulirani sadržaj kontroliranom brzinom i isključivo u određenim uvjetima (Desai i Park, 2005). Primjenom te tehnike aktivne komponente su kompletno obavijene, prekrivene i zaštićene fizičkom barijerom, čime je onemogućena njihova protruzija, odnosno oštećenje ili izobličavanje (Đorđević i sur., 2014). Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, aktivno sredstvo, punjenje, unutarnja faza, dok tvar u koju se inkapsulira nazivamo premaz, membrana, ljuska, nosač, vanjska faza ili matriks.

U prehrambenoj industriji inkapsulacija se najčešće odnosi na implementaciju bioaktivnih molekula (antioksidansa, mineralnih tvari, vitamina, fitosterola, masnih kiselina) i živih stanica (probiotika) u različite prehrambene proizvode.

Prednosti primjene mikroinkapsuliranih sastojaka su:

- olakšano rukovanje inkapsuliranom aktivnom komponentom (npr. inkapsulacija tekućine i dobivanje čvrstih inkapsulata koji su lakši za rukovanje)
- imobilizacija aktivnog sastojka u sistemima procesiranja prehrambenih proizvoda
- poboljšana stabilnost u konačnom proizvodu i tijekom procesiranja (npr. manje isparavanja tvari arome kao aktivnog sastojka i/ili smanjena degradacija ili interakcija s ostalim sastojcima proizvoda)
- poboljšana sigurnost (smanjena zapaljivost pojedinih komponenti)
- stvaranje određenih vizualnih efekata i privlačne teksture
- kontrolirano otpuštanje aktivne komponente
- maskiranje nepoželjnih mirisa i generalno prikriivanje nepoželjenih senzorskih svojstava aktivne komponente (Zuidam i Shimoni, 2010).



Osim brojnih prednosti, primjena inkapsulacije i njeno uvođenje u nove procese proizvodnje je ograničeno uslijed nedostataka koji se prije svega odnose na relativno visoku cijenu inkapsulacijskih tehnologija i složenost procesa proizvodnje. Osim toga, inkapsulirane aktivne tvari mogu stvoriti neke negativne promjene u samom proizvodu (promjena senzorskih svojstava) ili se oštetiti tijekom procesa proizvodnje (Zuidam i Shimoni, 2010). U tablici 1 prikazani su neki primjeri inkapsuliranih aktivnih tvari primjenom različitih nosača i tehnika inkapsulacije.

**Tablica 1.** Primjeri inkapsuliranih aktivnih tvari, korištenih tehnika inkapsulacije i odgovarajućih nosača za inkapsulaciju

| <b>Aktivna tvar/sastojak</b>   | <b>Metoda inkapsulacije</b> | <b>Nosač</b>                 | <b>Referenca</b>                |
|--|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| <b>Vitamin B12</b>   | Emulzifikacija              | Kazeinat/dekstran            | Fechner i sur., 2007            |
| <b>Vitamin D2</b>  | Mikroinkapsulacija micelama | Kazein                       | Semo i sur., 2007               |
| <b>Probiotici</b>  | Ionsko geliranje            | Alginat/kitozan              | Urbanska i sur., 2007           |
|  | Sušenje raspršivanjem       | Protein/ugljikohidrat sustav | Crittenden i sur., 2006         |
| <b>B-karoten</b>   | Ionsko geliranje            | Alginat, pektin              | Belščak-Cvitanović i sur., 2016 |
| <b>Polifenoli maslačka</b>   | Ionsko geliranje            | Alginat, pektin              | Belščak-Cvitanović i sur., 2016 |
| <b>Polifenoli ružmarina</b>  | Ionsko geliranje            | Kitozan                      | Xiao i sur., 2010               |
| <b>Polifenoli lista kupine, gloga, stolisnika, bršljana, koprive i masline</b> | Ionsko geliranje            | Alginat/kitozan              | Belščak-Cvitanović i sur., 2016 |

### 2.1.1. Primjena tehnike inkapsulacije u prehrambenoj industriji

Prehrambena industrija je pored farmaceutske najveći korisnik tehnike inkapsulacije i proizvoda inkapsulacije. Jedna od najvažnijih primjena inkapsulacije u prehrambenoj

industriji odnosi se na inkapsulaciju aroma i i aromatičnih komponenti. U području fermentacija, ova tehnika koristi se za inkapsulaciju stanica kvasca u procesima proizvodnje piva (Nedović, 1999), bioetanola (Nikolić i sur., 2009) i prirodnih aroma (Lalou i sur., 2013).

U prehrambenoj industriji inkapsulacija se koristi za implementaciju bioaktivnih molekula koje su iznimno osjetljive na okolišne uvjete, uvjete procesiranja hrane i/ili uvjete u gastrointestinalnom sustavu čovjeka (McClements i Lesmes, 2009). U posljednje vrijeme sve je veći interes znanstvenika, ali i industrije za tehnikom inkapsulacije, a posebno u području proizvodnje hrane. Nove tehnologije za direktnu primjenu u prehrambenoj industriji dobivaju sve veći interes u znanstvenim istraživanjima (Fountain, 2014; Gogova i sur., 2014). U tablici 2 nalazi se pregled prehrambenih proizvoda s inkapsuliranim aktivnim tvarima i sastojcima te primjenjenim metodama inkapsulacije.

**Tablica 2.** Pregled prehrambenih proizvoda s inkapsuliranim aktivnim tvarima i sastojcima

| <b>Aktivna tvar/sastojak</b>   | <b>Metoda inkapsulacije</b>              | <b>Hrana u koju je implementirana aktivna tvar/sastojak</b> | <b>Referenca</b>                 |
|--|--|---|----------------------------------|
| <b>Polifenoli iz sjemenki nara (punikalagini)</b>                    | Sušenje raspršivanjem                    | Sladoled  | Çam i sur., 2014                 |
| <b>Ekstrakt sjemenki grejpfruta</b>                                  | Sušenje raspršivanjem                    | Keksi   | Davidov-Pardo i sur., 2015       |
| <b>Likopen</b>   | Sušenje raspršivanjem                    | Kolač/biskvit   | Rocha i sur., 2012               |
| <b>Konjugirana linolna kiselina - CLA</b>                            | Sušenje raspršivanjem                    | Mliječni proizvodi  | Jimenez i sur., 2008             |
| <b>Probiotička kultura <i>L. Casei</i></b>                           | Sušenje raspršivanjem                    | Sok od mrkve  | Petreska-Ivanovska i sur., 2014  |
| <b>Probiotička kultura <i>L. Reuteri</i></b>                         | Sušenje raspršivanjem                    | Čokoladni soufflé   | Malmo i sur., 2013               |
| <b>Bakterije mliječne kiseline</b>                                   | Sušenje raspršivanjem                    | Kuhano mesno tijesto  | Pérez-Chabela i sur., 2013       |
| <b>Ekstrakt lista djeteline</b>                                      | Sušenje raspršivanjem                    | Sojino ulje   | Chatterjee i Bhattacharjee, 2013 |
| <b>Polifenoli biljke stolisnika (<i>Achillea millefolium</i> L.)</b> | Elektrostatska ekstruzija, liofilizacija | Čokolada  | Belščak-Cvitanović i sur., 2012  |
| <b>Probiotici</b>  | Ionsko geliranje                         | Mliječni proizvodi  | Amine i sur., 2014               |
|  |  |   | Sohail i sur., 2012              |

### 2.1.2. Metode inkapsulacije

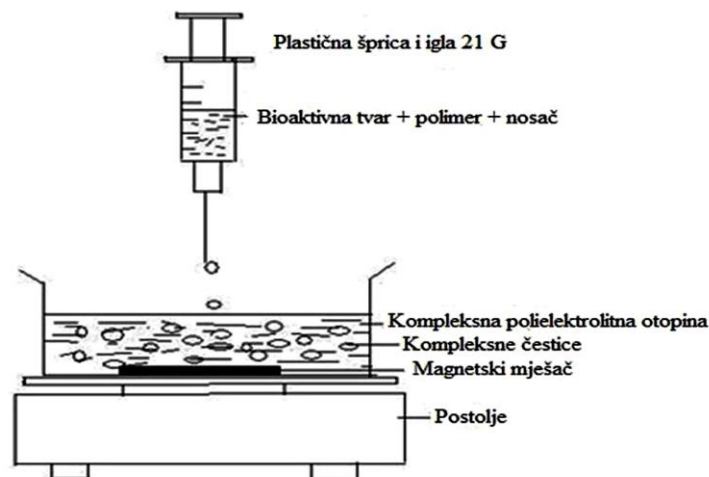
Prema izvedbi, metode inkapsulacije stanica i aktivnih tvari mogu se podijeliti u sljedeće četiri osnovne skupine:

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

Kod odabira metode inkapsulacije treba voditi računa o nekoliko važnih kriterija: cilju inkapsulacije, karakteristikama aktivne komponente, karakteristikama materijala nosača, zakonskoj regulativi, ekonomičnosti procesa itd. To su samo neke od stavki koje je potrebno uzeti u obzir prije bilo kakve upotrebe inkapsulacije ili njenog uvođenja u proces proizvodnje (Zuidam i Shimoni, 2010). S obzirom na navedeno, odabrana metoda trebala bi rezultirati visokom inkapsulacijskom učinkovitošću, mogućnošću inkapsulacije većeg udjela aktivnog sredstva, odgovarajućom veličinom dobivenih čestica poželjnih morfoloških karakteristika te bi trebala biti prikladna za industrijsku proizvodnju (Vladislavjevic, 2012).

#### 2.1.2.1. Ionsko geliranje

Jedna od najčešće korištenih tehnika inkapsulacije je ionsko geliranje. To je proces koji uključuje ekstruziju (istiskivanje) otopine polimera kroz iglu za ubrizgavanje, u kojoj je aktivni spoj otopljen ili dispergiran. Kapljice se prenose do sredstva za raspršivanje faza (gelirajućeg medija) te nakon reakcije prelaze u sferične čestice gela (slika 1) (Vandamme i sur., 2007).



**Slika 1.** Shematski prikaz formiranja čestica hidrogela primjenom ionskog geliranja (Patil i sur., 2012)

Tehnika ionskog geliranja je jednostavna i blaga, a čimbenici o kojima o kojima ovisi njezina učinkovitost, oblik i veličina nastalih čestica su:

- koncentracija polimera i kationa za geliranje
- temperatura, pH otopine za geliranje
- koncentracija bioaktivnog sastojka (Racovič i sur., 2009).

## 2.2. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari

Za inkapsulaciju čvrstih, tekućih ili plinovith aktivnih tvari različitih vrsta i karakteristika mogu se koristiti različiti materijali. Zakonska regulativa vezana uz prehrambene aditive i nutraceutike je mnogo stroža nego za farmaceutike. Materijali koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju moraju biti uvršteni u GRAS (eng. „*Generally Recognized as Safe*“) listu, odnosno biti prepoznati kao sastojci sigurni za korištenje u proizvodnji hrane.

Materijali koji se koriste za inkapsulaciju moraju biti „*food-grade*“, odnosno ne smiju kontaminirati hranu svojim sastojcima i komponentama koje s njom dolaze u izravni kontakt, te moraju biti biorazgradivi i sposobni izgraditi barijeru između jezgre materijala (aktivne tvari, punjenja) i njezine okoline. Također aktivnoj tvari moraju pružati najveći mogući stupanj zaštite od okolišnih uvjeta (vlaga, temperatura, pH) te je zadržavati unutar strukture mikrokapsule tijekom procesiranja i/ili skladištenja u različitim uvjetima. Ne smiju stupati u interakcije s inkapsuliranom aktivnom tvari i moraju posjedovati dobra reološka svojstva u visokim koncentracijama te moraju biti laki za rukovanje prilikom inkapsulacije (Wandrey i

sur., 2010). Materijali koji odgovaraju navedenim uvjetima su prirodno proizvedeni polimeri koji stvaraju hidrogelove-visokohidratizirane strukture sastavljene od unakrsno povezanih hidrofilnih polimera koji formiraju trodimenzionalne mreže (Uludag i sur., 2000).

U tablici 3 dana je podjela materijala koji se mogu uporiječiti kao nosači u procesu inkapsulacije ovisno o njihovom porijeklu.

**Tablica 3.** Podjela materijala za inkapsulaciju prema porijeklu (Wandrey i sur., 2010)

| Biljno porijeklo                      | Životinjsko i mikrobn<br>porijeklo | Dobiveni od<br>morskih<br>organizama | Ostali<br>materijali |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| Škrob i derivati                      | Ksantan                            | Karagenan                            | Parafin              |
| Celuloza i derivati                   | Gelan                              | Alginat                              | Polivinil piroidon   |
| Biljni ekstrudati (npr. guma arabika) | Dekstran                           |                                      | Polivinil alkohol    |
| Biljni ekstrakti (npr. galaktomanani) | Kitozan                            |                                      | Oksidi silicija      |
| Polisaharidi                          | Kazein                             |                                      | Oksidi aluminija     |
| Gluten                                | Proteini sirutke                   |                                      |                      |
| Biljni izolati (npr. izolati soje)    | Želatina                           |                                      |                      |
| Masne kiseline                        | Masne kiseline                     |                                      |                      |
| Alkoholi                              | Alkoholi                           |                                      |                      |
| Voskovi                               | Voskovi                            |                                      |                      |
| Fosfolipidi                           | Fosfolipidi                        |                                      |                      |
|                                       | Gliceridi                          |                                      |                      |

### 2.2.1. Proteini kao nosači za inkapsulaciju

Proteini su prirodni polimeri sastavljeni od aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Mogu biti dio strukturnog kompleksa prirodnih sastojaka (kao što su mlijeko, brašno, jaja, meso) ili mogu biti izolirani funkcionalni sastojci (kao što su želatina, proteini sirutke, kazeinat) (McClements i sur., 2009). Proteinska struktura ima četiri razine složenosti: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura. Osnovna građevna jedinica su aminokiseline koje mogu biti esencijalne i neesencijalne. Esencijalne se unose u organizam putem hrane bogate proteinima poput mesa, mahunarki, peradi, dok se neesencijalne sintetiziraju prirodno u našem organizmu (Devi i sur., 2016).

U svrhu formiranja nosača za inkapsulaciju bioaktivnih tvari, u posljednje vrijeme koristi se veliki broj različitih „*food-grade*“ proteina, poput kazeina i proteina sirutke iz mlijeka, ali i želatine, miozina iz ribe ili mesa te zeina iz kukuruza, glutena iz pšenice, proteina soje, proteina kikirikija ili proteina sjemenki pamuka. Pri temperaturi od 70 °C oni se

denaturiraju i postaju netopljivi, što im omogućava stvaranje ireverzibilnih gelova različite kvalitete. Skupljanje i geliranje proteina pogoduje stvaranju veza s inkapsuliranim sastojkom, a sama učinkovitost procesa geliranja može se pospješiti dodatkom iona u pregrijanu otopinu, u prvome redu iona kalcija (Wandrey i sur., 2010).

### **Proteini sirutke**

Proteini sirutke su globularni proteini dobiveni iz sirutke koja predstavlja sporedni proizvod u proizvodnji sira tj. koagulaciji kazeina. Sadrži kompleksnu strukturu globularnih proteina kao što je  $\alpha$ -lakalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, albumin goveđeg seruma, imunoglobulin te nekoliko drugih protein peptidnih komponenti koje uključuju laktoperoksidaze, lizozime, laktoferin itd. Najviše se koriste kao hidrogelovi te u nanočestičnom sustavu za inkapsulaciju i kontrolirano otpuštanje različitih aktivnih sastojaka (Devi i sur., 2016). Za inkapsulaciju se prvenstveno koriste zbog: blagog okusa, visoke topljivosti, niske viskoznosti te dobrih svojstava formiranja filma (Livney, 2010).

### **Zein**

Zein je protein koji služi kao glavno spremište metalnih iona i aminokiselina u kukuruzu. Sastoji se od četiri glavne komponente, a to su  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -zein (Shukla i Cheryan, 2001). Čestice s nosačem od zeina slabo se razgrađuju u želucu, pokazuju sporo otpuštanje u tankom crijevu, dok je otpuštanje u debelom crijevu izrazito brzo (Parris i sur., 2005). Takvo svojstvo zeina kao nosača za inkapsulaciju izrazito je pogodno budući da se većina biološki aktivnih spojeva lako degradira prije apsorpcije u debelom crijevu. Najznačajnije svojstvo zeina kao nosača za inkapsulaciju je sposobnost samosmatanja u mikrokapsule u prisutnosti polarnog otapala (Wang i Padua, 2012).

### **Želatina**

Želatina je polipeptid visoke molekularne mase dobiven denaturacijom kolagena, koji daje potporu tkivima i organima te je glavni sastojak životinjskog vezivnog tkiva. Zbog svojih svojstava poput dobre biokompatibilnosti, ekološke prihvatljivosti te biorazgradivosti, može se koristiti kao nosač za inkapsulaciju različitih bioaktivnih tvari te se koristi u raznim farmaceutskim primjenama. Također, primjenjuje se u obliku složenih koacervata za inkapsulaciju različitih aktivnih sastojaka (Devi i sur., 2016).

### **2.2.2. Polisaharidi kao nosači za inkapsulaciju**

Polisaharidi su ugljikohidratne molekule koje sadrže dugačke monosaharidne lance povezane glikozidnim vezama. Polisaharidi se mogu naći u puno različitih izvora kao što su biljke, mikrobi, alge te izvori životinjskog porijekla. Imaju velik broj reaktivnih, funkcionalnih grupa, promjenjiv kemijski sastav, različite raspone molekularne težine, koje određuju njihove različitosti u strukturi i svojstvima. S obzirom na strukturu, imaju različita fizikalna i kemijska svojstva od njihovih monosaharidnih jedinica (Devi i sur., 2016).

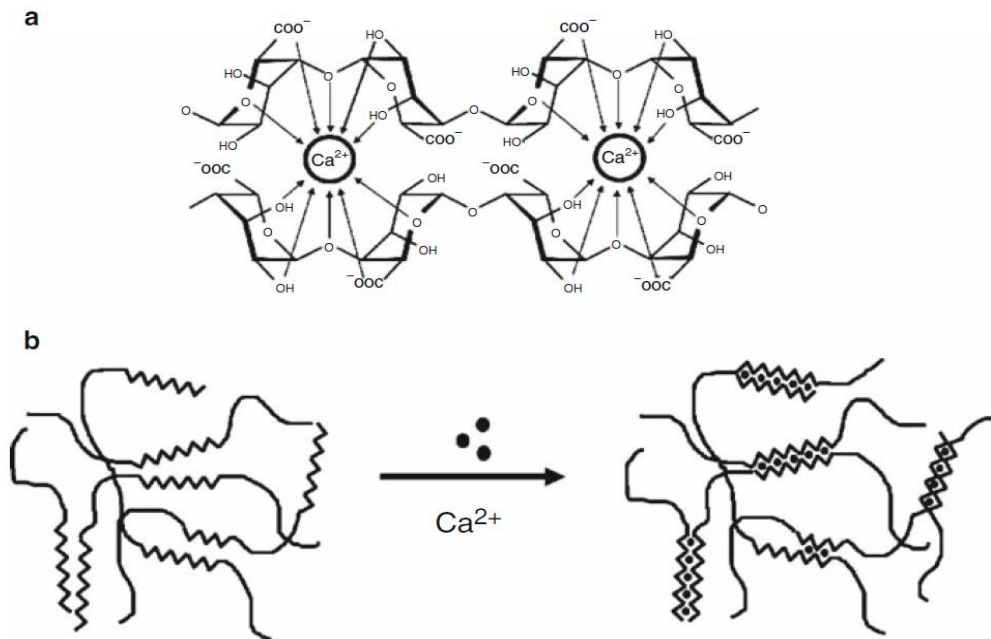
U svrhu formiranja nosača za inkapsulaciju koristi se veliki broj polisaharida, poput škroba i njegovih derivata, derivata celuloze, kitozana, alginata, karagenana, pektina, ksantan gume, guar gume, gume sjemenki rogača – karuba gume itd. (Cui, 2005). S obzirom na molekularnu razinu, ovi se polisaharidi razlikuju prema molekularnoj masi, stupnju razgranatosti, konformaciji, električnom naboju i hidrofobnosti. Općenito, razlike u molekularnim karakteristikama biopolimera uvjetovat će razlike u njihovoj sposobnosti da stvaraju strukturirane nosače za inkapsulaciju bioaktivnih tvari, ali i razlike u fizikalno-kemijskim karakteristikama i funkcionalnosti formiranih nosača (Benichou i sur., 2002; Norton i Frith, 2001; Schmitt i sur., 1998). Jedno od korisnih svojstava polisaharida kao nosača za inkapsulaciju je njihova sposobnost da formiraju kinetički metastabilne amorfne staklaste krutine. Njihova sposobnost povezivanja specifičnih molekula dodaje se njihovoj strukturnoj ulozi (Augustin i Hemar, 2008). Kada se šećeri koriste u kombinaciji s proteinima u sušenom obliku, šećer također stabilizira proteine tijekom dehidratacije vezanjem vodika. Dobivena stabilizacija ovisi o strukturi šećera. Upotreba visokih koncentracija šećera male molekularne mase u formulacijama namjenjenim sušenju može dovesti do ljepljivih prašaka zbog njihove niske temperature staklastog prijelaza. U odnosu na proteine, polisaharidi tvore gelove pri nižim koncentracijama.

Ugljikohidrati imaju važnu ulogu u stabilizaciji emulzije zbog povećanja viskoznosti kontinuirane faze. S obzirom na to da nisu površinski aktivni moraju se koristiti u kombinaciji s drugim sastojcima koji imaju dobra emulzificirajuća svojstva (npr. proteini ili površinski aktivni sastojci niske molekularne mase) pri formuliranju sustava za inkapsulaciju na bazi emulzije. Iznimka je guma arabika, koja zbog površinske aktivnosti osigurava strukturnu stabilnost i za sustave vlažnog i suhog inkapsuliranja (Augustin i Hemar, 2008).

#### **Alginat**

Alginat je prirodni polimer ekstrahiran iz smeđih morskih algi te jedan od najčešće korištenih biopolimera za inkapsulaciju stanica. To je prirodni anionski polisaharid koji se

sastoji od linearnih lanaca  $\alpha$ -L-guluronske kiseline i  $\beta$ -D-manuronske kiseline povezane  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom. Najznačajnija karakteristika alginata je sposobnost stvaranja gela u prisustvu određenih kationa. Alginati pokazuju specifičan afinitet prema vezivanju određenih kationa:  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ . Divalentni kationi vežu se za guluronske blokove alginatnih lanaca. Guluronski blokovi jednog polimera stvaraju veze sa susjednim polimernim lancima, pri čemu se stvara struktura poznata pod nazivom „kutija za jaja” („egg box”) i rezultira stvaranjem gel strukture (Lee i Mooney, 2011).



**Slika 2.** Mehanizam formiranja alginatnog gela u prisustvu  $\text{Ca}^{2+}$  (model „kutije za jaja”) (a); shematski prikaz interakcije između lanaca alginata pri formiranju gela (b) (Donati i sur., 2009).

## **Pektin**

Pektin je prirodni, netoksični polisaharid dobiven ekstrakcijom iz kore citrusa ili mesnatog dijela jabuke, a koristi se kao sredstvo za zgušnjavanje i geliranje. To je makromolekula sastavljena od jedinica D-galakturonske kiseline povezanih  $\alpha$ -1,4 glikozidnom vezom. Sposobnost stvaranja gela u prisustvu divalentnih kationa je slična kao kod alginata:  $\text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ , pri čemu  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  nemaju sposobnost stvaranja gela. Pektin ima slična svojstva kao i alginat, a to je zbog posjedovanja poli- $\alpha$ -(1-4)-D-galakturonske kiseline koja je gotovo zrcalna slika poli- $\alpha$ -(1-4)-D-guluronske kiseline. Jedina razlika je u tome što je kod poli- $\alpha$ -(1-4)-D-guluronske kiseline 3-hidroksilna skupina aksijalna (Racovič i sur., 2009).



## **Kitozan**

Kitozan je linearni polisaharid izgrađen od nasumice raspoređenih D-glukozamina (deacetilirana jedinica) i N-acetil-D-glukozamina (acetilirana jedinica) koji su međusobno povezani  $\beta$ -(1→4) glikozidnom vezom. Komercijalno se proizvodi deacetiliranjem hitina, strukturnog elementa skeleta rakova i staničnih stijenki gljivica. Važna svojstva kitozana su biorazgradivost, biokompatibilnost, netoksičnost itd. Kitozan se može koristiti u raznim područjima kao što su biomedicina, poljoprivreda, pri obradi vode, u kozmetičkoj te prehrambenoj industriji. Osim toga, mnogi derivati kitozana s različitim funkcionalnim svojstvima mogu biti pripremljeni kemijskim modifikacijama poput fosforilacije, karboksimetilacije, tiolacije itd. Ti derivati uglavnom se koriste u različitim područjima zbog njihove poboljšane topljivosti u vodenom mediju (Devi i sur., 2016).

## **Karagenan**

Karagenan je sulfatirani polisaharid visoke molekularne mase izgrađen od D-galaktoze i 3,6-anhidro-D-galaktoze izoliranih iz crvenih algi. Postoje tri vrste karagenana: kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) i lambda ( $\lambda$ ), a razlikuju se u broju sulfatnih grupa. Koristi se kao emulgator i zgušnjivač te gelirajuće sredstvo u prehrambenoj industriji (Devi i sur., 2016).

## **Guma arabika**

Guma arabika je prirodna guma dobivena iz stabla akacije. Po sastavu je smjesa polisaharida s udjelom od 90-99% arabinogalaktana i 1% glikoproteina, odnosno to je anionski polisaharid koji se često koristi u industriji zbog visokih emulgirajućih te inkapsulacijskih svojstava te visoke topljivosti i niske viskoznosti (Devi i sur., 2016).

### **2.2.3. Lipidi kao nosači za inkapsulaciju**

Lipidi su spojevi topljivi u organskim otapalima, ali netopljivi ili slabo topljivi u vodi (McClements, 2005). To je grupa spojeva koja sadrži veliki broj različitih vrsta molekula, uključujući acilglicerole, masne kiseline i fosfolipide.

Najvažnija fizikalno-kemijska svojstva lipida kad se koriste kao strukturni nosači su:

- ne miješaju se s vodom
- sposobnost otapanja s lipofilnim komponentama
- reološka svojstva
- čvrsti sadržaj masti u odnosu na temperaturni profil
- priroda svih formiranih kristala

- kemijska stabilnost (McClements, 2009).

U tu svrhu najčešće se koriste masne kiseline i alkoholi, voskovi (pčelinji vosak, karnauba vosak, kandelila vosak), gliceridi te fosfolipidi (Gasperini i sur., 2014).

### **Voskovi**

Prema porijeklu voskovi se dijele na prirodne i umjetne. U grupu prirodnih spadaju biljni, životinjski i voskovi fosilnog (mineralnog) porijekla (Endlein i Peleikis, 2011). U grupu biljnih voskova spadaju voskovi koji nastaju kao posljedica metabolizma biljaka, gdje je jedan od najvažnijih karnauba vosak.

#### **2.2.4. Sintetski materijali kao nosači za inkapsulaciju**

Sintetski materijali spadaju u grupu makromolekularnih ili polimernih tvari, tvari sastavljenih od makromolekula. Tijekom postupka sintetičke proizvodnje dolazi do reakcije međusobnog umrežavanja manjih molekula ili stvaranja lanaca te dolazi do formiranja makromolekula. Od sintetskih materijala koji se mogu koristiti za inkapsulaciju treba spomenuti polivinil pirolidon (PVP), koji se ističe dobrim svojstvima kompleksiranja mnogih kemijskih spojeva, zbog čega se koristi kao nosač aroma i vitamina, te dobrim termičkim svojstvima (Wandrey i sur., 2010). Uz PVP često se koristi i polivinil alkohol (PVA) u kombinaciji s alginatom, kako bi se dobile čestice željenih svojstava (Bezbradica i sur., 2004). U posljednje vrijeme sve se više radi na otkrivanju novih i proučavanju postojećih materijala kako bi se dobila biorazgradiva ambalaža i ujedno našla zamjena za postojeće plastične materijale. Polivinil alkohol je jedan od materijala koji se proučava kao potencijalni materijal za dobivanje biorazgradive plastike (Goodship i Jacobs, 2009).

### **Polivinil alkohol (PVA)**

PVA je sintetski polimer koji se zahvaljujući svojim karakteristikama koristi u raznim industrijama. Djelomično hidrolizirani PVA koristi se u prehrambenoj industriji, gdje služi kao zaštita proizvoda od utjecaja vlage, a predstavlja i dobru zaštitu od kisika i drugih vanjskih utjecaja pri čemu može maskirati okus i miris proizvoda. Također, može se koristiti u dodacima prehrani, proizvodnji sladoleda, nekih mliječnih proizvoda te proizvoda na bazi žitarica (Saxena, 2004).

### **2.3. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Ružmarin je biljka iz porodice *Lamiaceae*, zimzeleni višegodišnji grm koji doseže visinu od 2 m. Cvjetovi su sitni, svijetloplave do lila boje. Listovi su uvijeni, kožasti, na licu tamnozeleni i glatki, a naličje je sivkastobijelo i dlakavo (Lorenzi i de Abreu Matos, 2002). Za ružmarin je karakterističan aromatičan miris listova i cvjetova koji je posljedica nakupljanja aromatičnog ulja (Marin i sur., 2006). Iznimno je važna ljekovita i aromatična biljka koja se kultivira dugi niz godina. Postoje antropološki i arheološki dokazi o njegovoj primjeni u ljekovite, kulinarske i kozmetičke svrhe još s područja starog Egipta, Mezopotamije, Indije i Kine, a i danas je njegoova primjena raširena u cijelom svijetu. Zbog kemijskog sastava, odnosno prisutnosti polifenolnih spojeva koji su jaki antioksidansi, ekstrakt ružmarina koristi se u prehrambenoj i industriji lijekova te se primjenjuje u liječenju različitih bolesti (Cuvelier i sur., 1996; Fadel i El-Massry, 2000). Najčešće se koristi protiv migrene, bolova u abdomenu, zacjeljivanje rana, kao diuretik, analgetik, antireumatik i antidepresiv (Karakurum Göksel i sur., 2014). Također, eterična ulja, infuzije i ekstrakti cijele biljke koriste se kod probavnih smetnji, srčanih tegoba, upala, nekih zaraza i kod poboljšanja pamćenja (Sasikumar, 2012).

#### **2.3.1. Bioaktivni sastav ružmarina**

Za antioksidacijski kapacitet biljnog ekstrakta ružmarina odgovorne su tri sljedeće skupine spojeva: fenolni diterpeni, flavonoidi i fenolne kiseline. Od ukupnog sastava fenolnih kiselina, 2-3% otpada na ružmarinsku, klorogensku i kafeinsku kiselinu. Ekstrakt sadrži i fenolne diterpenoidne opore spojeve, koji uključuju do 4,6% karnozola, rozmaridifenola, rozmanola, zatim oleanoličnu, ursoličnu kiselinu kao predstavnike triterpenoidnih kiselina; te flavonoide apigenin, luteolin, nepetin, nepitrin. Sadrži i tanine i eterična ulja u udjelu od 1,2-2,5% (Bele i sur., 2010). Glavni antioksidativni spojevi ove biljne vrste su karnozinska kiselina i karnozol, abietanski diterpeni, ružmarinska kiselina i esteri hidroksicimetne kiseline (Wellwood i Cole, 2004; Peñuelas i Munné-Bosch, 2005). Navedeni spojevi, zajedno s drugim izoprenoidima (sterolima, izoprenima, mono- i diterpenima, tokoferolima ili karotenoidima) imaju fotoprotektivne uloge te se smatraju bioaktivnim spojevima (Almela i sur., 2006).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijal**

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

U ovom radu, za izdvajanje polifenolnih spojeva kao aktivnih sastojaka za inkapsulaciju korišten je suhi ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (berba 2015. godina), podrijetlom s Visa. Uzorak je kupljen u specijaliziranoj trgovini za prodaju ljekovitog bilja, Suban d.o.o. Uzorak je prije ekstrakcije usitnjen u električnom mlinu do željene veličine čestica i prosijan radi postizanja ujednačene veličine čestica.

##### **3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta ružmarina**

Ekstrakt ružmarina pripremljen je prelijevanjem 20 g usitnjenog uzorka s 200 mL destilirane vode zagrijane na 80 °C. Ekstrakcija se provodila 30 minuta pri konstantnoj temperaturi od 80 °C kako ne bi došlo do degradacije polifenola pri višoj temperaturi, uz konstantno miješanje. Nakon provedene ekstrakcije ekstrakt ružmarina procijeđen je kroz metalno cjedilo s nekoliko slojeva gaze te nadopunjen do volumena od 200 mL i ohlađen na sobnu temperaturu.

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

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

##### Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

##### Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

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

### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom

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

### Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica

- Natrijeva sol alginske kiseline niske viskoznosti Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Izolati proteina sirutke, Davisco Foods international (La Suer, SAD)
- Zelena kava (Etiopija)
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrij citrat, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrij hidrogen o-fosfat bezvodni, Fisher Chemical (Loughborough, Velika Britanija)
- Natrij dihidrogenfosfat-dihidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Kvarcni pjesak (oprani i žareni), Gram-mo d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

### **3.1.2. Aparatura i pribor**

#### Priprema ekstrakta

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

### Spektrofotometrijske analize

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

### Inkapsulacija

- Plastične šprice volumena 2 i 5 mL
- Igle 27G (0,4x13) i 18G (18x40mm)
- Čaše volumena 50 do 250 mL
- Metalno cjedilo
- Plastične epice volumena 2 mL
- Plastične epruvete volumena 15 mL
- Magneti
- Magnetska mješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)

### Karakterizacija čestica

- Aluminijske posudice s poklopcima, termometar, eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- Magnetska mješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak=0,2 mm) (Naarden, Nizozemska)
- TA.HDPlus analizator teksture, Stable Micro Systems (grad, Velika Britanija)
- Cilindrična čelična sonda P/2, Stable Micro Systems (grad, Velika Britanija)
- Kolorimetar, CM – 700d, CM – A177, Konica Minolta (Tokio, Japan)
- Mikroskop Leica DM1000 LED (Cambridge, Velika Britanija)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

#### Princip metode

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

#### Postupak rada:

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

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

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

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u dvije

paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g čestica.

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

#### Princip metode

Određivanje hidroksicimetnih kiselina (HCA) bazira se na reakciji kiselinske hidrolize koja je popraćena nastankom ružičasto-crvenkastog obojenja, čiji se intenzitet određuje mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

#### Postupak rada

Za određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina, 500 µL uzorka pomiješa se u epruveti sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnow-og reagensa, 1 mL 8,5%-tne vodene otopine NaOH te se doda 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se zatim izmiješa te se apsorbancija odmah zatim očita na 490 nm (Matkowski i sur., 2008). Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu.

Udjel hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

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

gdje su:

x – udjel kafeinske kiseline (mg/L),

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm.

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



### 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

#### Princip metode

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

#### Postupak rada

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS+ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 µL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1%, tako da apsorbancija te otopine iznosi  $0,70 \pm 0,02$ .

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

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

Jednadžba baždarne krivulje:

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

gdje su:

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

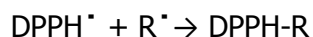
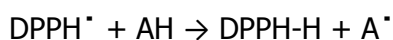
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

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

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

#### Princip metode

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



#### Postupak rada

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

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

Jednadžba baždarne krivulje:

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

gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

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

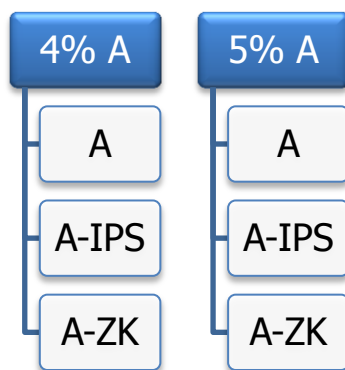
### **3.2.5. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina u sustave nosača na bazi alginata**

Kao materijali za formuliranje različitih sustava nosača na bazi alginata korišteni su prirodni biopolimeri: alginat niske viskoznosti (A), izolati proteina sirutke (IPS) te zelena kava (ZK). Otopina alginata pripravljena je u koncentracijama od 4% i 5% (w/v), dok je koncentracija ostalih materijala dodanih u alginatni gel iznosila 20% (w/v). Otopine pojedinačnih nosača pripravljene su otapanjem navedenih materijala u prethodno pripravljenom ekstraktu ružmarina, nakon čega su homogenizirane na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi tijekom 24 h te zatim pomiješane u odgovarajućem omjeru. Pri tome su formulirani sljedeći sustavi:

- Čisti alginat: A (4% i 5%, w/v)
- Alginat + izolati proteina sirutke: A-IPS (80:20, w/w)
- Alginat + zelena kava: A-ZK (80:20, w/w)

Otopine za geliranje pripravljene su otapanjem 3%-tnog kalcijevog klorida u ekstraktu ružmarina (w/v). Formiranje čestica ionskim geliranjem provedeno je ukapavanjem pripravljenih sustava nosača pomoću plastične šprice i igle od 27G (0,4x13 mm) i 18G (18x40 mm) (u slučaju zelene kave) u prethodno pripravljene otopine za geliranje. Otopine za geliranje tijekom postupka inkapsulacije miješane su na magnetskoj miješalici, pri čemu je dolazilo do očvršćivanja kapi i formiranja u čestice sferičnog oblika. Nakon formiranja svih čestica, čestice su miješane u gelirajućem mediju dodatnih 30 min, nakon čega su izdvojene iz otopine kalcijevog klorida filtriranjem, isprane u ekstraktu te spremljene u ekstrakt na +4 °C do analiza. Osim toga, pripravljene su kontrolne čestice na način kao i prethodno opisani sustavi nosača na bazi alginata, koji su umjesto polifenolnog ekstrakta ružmarina sadržavali destiliranu vodu.

U ovom istraživanju formirano je 6 različitih sustava nosača na bazi alginata s imobiliziranim polifenolnim ekstraktom ružmarina (slika 3).



**Slika 3.** Prikaz formuliranih sustava nosača na bazi alginata s inkapsuliranim polifenolima ružmarina

### 3.2.6. Karakterizacija čestica s inkapsuliranim polifenolima ružmarina

#### 3.2.6.1. Određivanje udjela vode

##### Princip metode

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

##### Postupak rada

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

$$\text{Udjel vode (\%)} = (a-b) \cdot 100 / m$$

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

gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

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

### **3.2.6.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika hidrogel čestica**

#### Određivanje veličine formuliranih čestica

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

#### Određivanje parametara teksture formuliranih čestica

Analiza teksture provedena je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), opremljenom s utegom od 5 kg. Analize su provedene na sobnoj temperaturi na tri različite hidrogel čestice svakog sustava. U svrhu postizanja maksimalnog omjera kompresije i smicanja, za probijanje uzoraka korištena je cilindrična čelična sonda P/2 (Stable Micro Systems, Velika Britanija) s ravnim dnom, uz brzinu prodiranja od 0,5 mm/s. Dobiveni dijagrami obrađeni su u Texture Exponent programu (Stable Micro Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za ispitivane parametre teksture (tvrdoća i elastičnost). Tvrdoća uzorka izražena je kroz maksimalnu silu (N) potrebnu za kompresiju uzoraka, dok se maksimalna udaljenost sonde prilikom probijanja uzorka ispod krivulje (sile) koristi za računanje elastičnosti (mm). Elastičnost je izražena na 50% vrijednosti očitane za tvrdoću. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja (n=3) s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### Određivanje morfoloških karakteristika formuliranih čestica

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

### **3.2.6.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica**

Određivanje boje hidrogel čestica provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan), pri čemu je dobivena reflektancija uzoraka u čitavom području vidljivog spektra te  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Nelinearni odnosi za  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti imaju zadatak imitirati

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

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

gdje je:

$\Delta E^*$  - promjena boje ispitivanih uzoraka u odnosu na referentni uzorak

$L^*$  - svjetlina boje ispitivanog uzorka u  $L^* a^* b^*$  sustavu

$a^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka (crveno)

$b^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka (žuto)

$L_{ref}^*$  - svjetlina boje referentnog uzorka – čestice pripremljene s čistim alginatom

$a_{ref}^*$  - parametar boje referentnog uzorka (crveno)– čestice pripremljene s čistim alginatom

$b_{ref}^*$  - parametar boje referentnog uzorka (žuto) – čestice pripremljene s čistim alginatom

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

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

Udjel ukupnih polifenola i hidrosicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet u formiranim hidrogel česticama na bazi alginata određen je otapanjem 0,5 g hidrogel čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici, do potpunog raspada hidrogel čestica. Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica

određen je primjenom Folin-Ciocalteu reagensa (opisano u poglavlju 3.2.1.), udjel hidrosicimetnih kiselina određen je u reakciji s Arnow-im reagensom (opisano u poglavlju 3.2.2.), dok je određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode opisano u poglavlju 3.2.3., a primjenom DPPH metode u poglavlju 3.2.4. Učinkovitost inkapsulacije polifenola (%) i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta (%) izračunata je kao omjer udjela ukupnih polifenola i hidrosicimetnih kiselina te antioksidacijskog kapaciteta u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih spojeva u početnim otopinama sustava nosača pripremljenih u ekstraktu ružmarina.

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

Otpuštanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih hidrogel čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola (3.2.1.) i udjela hidrosicimetnih kiselina (3.2.2.) te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS (3.2.3.) i DPPH (3.2.4.) metoda. Prema protokolu europske farmakopeje (European Pharmacopeia 7.0, 2010) pripremljene su simulirane gastrična i intestinalna otopina, a iste nisu sadržavale odgovarajuće enzime (pepsin i pankreatin). SGF je pripremljen s natrijevim kloridom i klorovodičnom kiselinom (pH=1,2), dok se za SIF koristio odgovarajući fosfatni pufer (pH=7,4). Čestice dobivene ionskim geliranjem izdoje se iz ekstrakta u kojem se čuvaju te se 0,6 g profiltriranih čestica prelije s 30 mL SGF-a temperature 37°C. Čestice se u SGF-u konstantno miješaju na magnetskoj miješalici pri 100 rpm-a i konstantnoj temperaturi od 37°C. U određenim vremenskim razmacima iz otopine s česticama izuzima se 2 mL tekućeg medija te se nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama dodaje po 2 mL svježeg SGF-a. Uzorkovanje se provodi u vremenskom periodu od 2 h. Nakon 2 h čestice se profiltriraju iz otopine SGF-a, posuše te preliju s 30 mL SIF-a prethodno zagrijanog na 37°C, uz konstantno miješanje (100 rpm) na istoj temperaturi. Postupak uzorkovanja provodi se kao i kod SGF-a prema prethodno opisanom načinu, sve dok se čestice u potpunosti ne raspadnu. U dobivenim alikvotima od 2 mL određuje se udjel ukupnih polifenola (mg ekvivalenta galne kiseline/g čestica), hidrosicimetnih kiselina (mg kafeinske kiseline/g čestica) i antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/g čestica). Na temelju dobivenih rezultata određuje se profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ružmarina iz ispitivanih sustava nosača na bazi alginata.

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

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

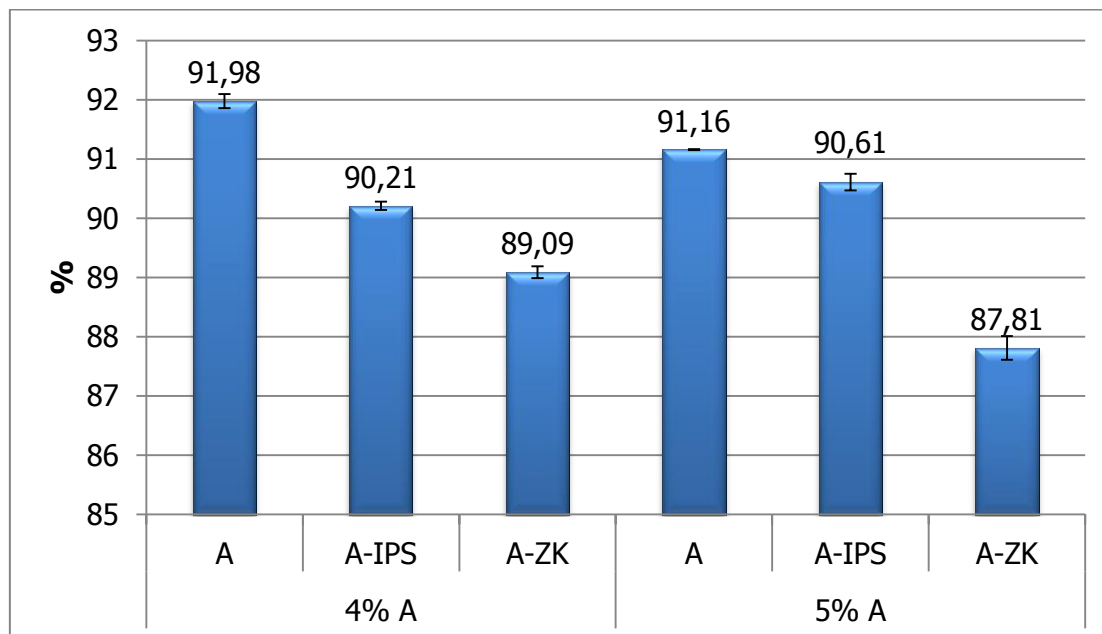


#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj koncentracije i sastava različitih sustava nosača na inkapsulacijsku učinkovitost polifenolnih spojeva ekstrakta ružmarina primjenom ionskog geliranja. Kao osnovni nosač za inkapsulaciju koristio se alginat pripremljen u različitim koncentracijama (4% i 5%) te njegove kombinacije s izolatima proteina sirutke (IPS) i zelenom kavom (ZK) koja do sada nije korištena u svrhu imobilizacije polifenolnih spojeva.

Hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina određen je udjel vode (slika 4), fizikalne karakteristike (veličina čestica, parametri teksture) koje su prikazane u tablici 4 te morfološke karakteristike (izgled čestica) prikazane na slikama 5 i 6. Određivanje parametara boje formiranih hidrogel čestica prikazano je u tablici 5. Utjecaj koncentracije alginata (4% i 5%) i dodatnih materijala (IPS i ZK) u sustavu alginata na učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina ekstrakta ružmarina prikazani su na slici 7, dok je na slici 8 prikazana učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metoda. Profil otpuštanja ukupnih polifenola iz hidrogel čestica s imobiliziranim polifenolnim ekstraktom ružmarina u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima prikazan je na slici 9, hidroksicimetnih kiselina na slici 10, a otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica na slikama 11 (ABTS) i 12 (DPPH). Omjer povećanja mase liofiliziranih čestica nakon vezanja vode prikazan je u tablici 6.

#### 4.1. Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina



**Slika 4.** Udjel vode (%) u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

Iz grafičkog prikaza podataka o udjelu vode u formuliranim hidrogel česticama, dobivenih kao rezultat omjera masa uzoraka prije i nakon sušenja, vidljivo je da su najveći udjel vode, među svim ispitanim česticama, sadržavale čiste alginatne čestice (slika 4). Upotreba 4%-tnog čistog alginata rezultirala je neznatno većim udjelom vode (91,98%) u odnosu na sustav pripremljen s 5%-tnim alginatom (91,16%). Kod čestica s 4%-tnim alginatom udjel vode bio je veći u sustavu A-IPS (90,21%) u odnosu na sustav A-ZK (89,09%). Isti trend vidljiv je i kod čestica pripremljenih s 5%-tnim alginatom: A-IPS (90,61%) > A-ZK (87,81%). Najmanji udjel vode među svim česticama sadržavale su alginatne čestice s zelenom kavom pripremljene s 5% A (87,81%). Dodatak drugih prirodnih materijala (IPS i ZK) u alginatni gel rezultirao je smanjenjem udjela vode (i sukladnim povećanjem udjela suhe tvari u česticama), što pokazuje da dodatak drugih biopolimera, kao nosača u gel mrežu alginata, smanjuje udjel vode u matriksu gela (popunjavajući prostor između čestica), što je potvrđeno i u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Souze i suradnika (2012), koje je dokazalo da se ionskim geliranjem prirodnih biopolimera veže velika količina vode unutar gela, kao i s istraživanjem Tella i suradnika (2015), koje je potvrdilo da alginatne mikročestice sadrže visoki udjel vode (94 - 96%), što je također u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

## 4.2. Fizikalne i morfološke karakteristike hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

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

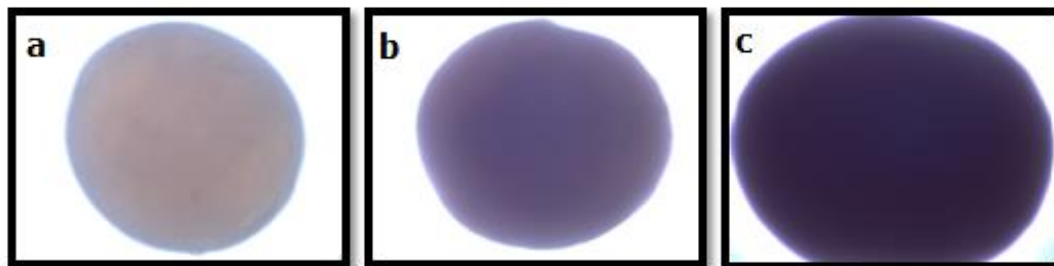
| Noslač |       | Veličina (mm) | Tvrdoća (N) | Elastičnost (mm) |
|--------|-------|---------------|-------------|------------------|
| 4% A   | A     | 1,98 ± 0,10   | 0,22 ± 0,01 | 0,31 ± 0,01      |
|        | A-IPS | 2,14 ± 0,13   | 0,14 ± 0,01 | 0,28 ± 0,00      |
|        | A-ZK  | 2,86 ± 0,17   | 0,13 ± 0,02 | 0,27 ± 0,01      |
| 5%A    | A     | 2,25 ± 0,11   | 0,23 ± 0,00 | 0,32 ± 0,00      |
|        | A-IPS | 2,17 ± 0,12   | 0,16 ± 0,01 | 0,30 ± 0,00      |
|        | A-ZK  | 3,27 ± 0,13   | 0,14 ± 0,00 | 0,27 ± 0,00      |

U tablici 4 prikazan je utjecaj različitih koncentracija alginata i dodatka pomoćnih nosača u alginatni matriks gela na parametre veličine, tvrdoće i elastičnosti hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina.

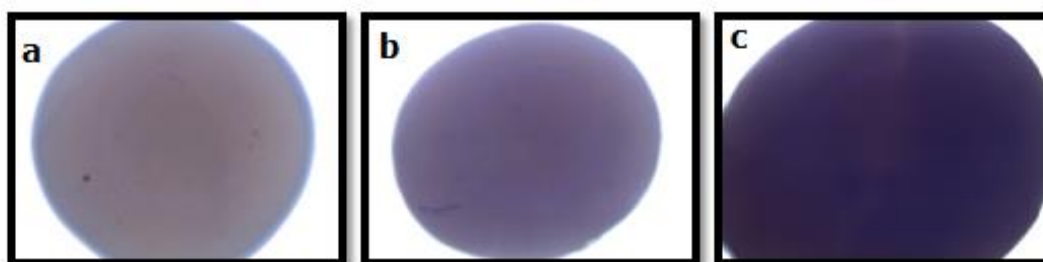
S obzirom na dobivene rezultate istraživanja može se zaključiti da povećanje koncentracije alginata rezultira povećanjem veličine formuliranih hidrogel čestica. Korištenjem 4%-tne koncentracije alginata najmanja veličina čestica dobivena je u sustavu s čistim alginatom (1,98 mm), što nije slučaj i kod 5%-tnog alginata, gdje je najmanja veličina čestica dobivena u sustavu A-IPS (2,17 mm). Čestice najvećeg promjera su u oba slučaja bile kod kombinacije alginata sa zelenom kavom. Razlog tome je korištenje igle većeg promjera za inkapsulaciju ekstrakta ružmarina u odnosu na igle korištene za inkapsulaciju drugih sustava nosača, budući da se sam prah mljevenog zrna zelene kave sastojao od većih, netopljivih čestica, koje su zahtijevale inkapsulaciju iglom većeg promjera.

Vrijednosti dobivene za tvrdoću i elastičnost pokazuju da najveću tvrdoću i elastičnost bez obzira na koncentraciju alginata imaju čiste alginatne čestice, dok dodatak IPS i ZK u alginat daje čestice manje tvrdoće i elastičnosti. Čestice veće tvrdoće bile su također i elastičnije, što je u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2016). Među svim promatranim sustavima najtvrde čestice (0,23 N) i najelastičnije čestice (0,32 mm) bile su čiste alginatne čestice pripremljene s 5%-tnim alginatom (Tablica 4). Prema rezultatima prikazanim u tablici može se zaključiti da su upotrebom veće koncentracije alginata dobivene tvrde i elastičnije čestice. Također, usporedbom rezultata za tvrdoću čestica i rezultata za

udjel vode može se zaključiti da su čestice koje su sadržavale veći udjel vode imale i veće vrijednosti tvrdoće.



**Slika 5.** Mikroskopska slika hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina pripremljenih s 4%-tnim alginatom (a-c): a-alginat (čisti); b-alginat i izolati proteina sirutke; c-alginat i zelena kava



**Slika 6.** Mikroskopska slika hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina pripremljenih s 5%-tnim alginatom (a-c): a-alginat (čisti); b-alginat i izolati proteina sirutke; c-alginat i zelena kava

Promatranjem morfoloških karakteristika ispitivanih hidrogel čestica na slikama 5 i 6 vidljivo je da su čestice pripremljene s čistim alginatom, kod obje koncentracije alginata, imale najpravilniji oblik te su pokazale visoku sferičnost. Dodatak dodatnih nosača rezultirao je promjenom morfoloških karakteristika te smanjenom sferičnosti čestica. Nije bilo velikih razlika u morfološkim karakteristika čestica ovisno o korištenoj koncentraciji alginata. Neznatno manju pravilnost oblika u odnosu na čestice formulirane s čistim alginatom, pokazale su i čestice dobivene kombinacijom alginata i izolata proteina sirutke, kod obje koncentracije alginata. Čestice A-ZK (4% i 5%), koje su ujedno bile i najveće, pokazale su najveća odstupanja u pravilnosti oblika. To se može pripisati manje homogenoj otopini nosača za inkapsulaciju i korištenju igle većeg promjera. Također, i druga istraživanja su pokazala da se dodatak drugih materijala u svrhu formiranja binarnih nosača

za inkapsulaciju negativno odražava na morfologiju nastalih čestica, smanjujući njihovu sferičnost (Belščak-Cvitanović i sur., 2016; Al-Rousan i sur., 2007).

#### 4.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

**Tablica 5.** Parametri boje hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

| Noslač |       | $L^*$        | $a^*$       | $b^*$        | $\Delta E^*$ |
|--------|-------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| 4% A   | A     | 52,75 ± 0,06 | 1,98 ± 0,16 | 22,56 ± 0,11 | -            |
|        | A-IPS | 48,96 ± 0,09 | 4,22 ± 0,05 | 21,55 ± 0,07 | 4,52 ± 0,09  |
|        | A-ZK  | 40,89 ± 0,13 | 5,51 ± 0,03 | 20,48 ± 0,09 | 12,55 ± 0,13 |
| 5% A   | A     | 53,88 ± 0,05 | 1,93 ± 0,10 | 21,99 ± 0,07 | -            |
|        | A-IPS | 49,47 ± 0,01 | 3,74 ± 0,04 | 21,31 ± 0,04 | 4,81 ± 0,00  |
|        | A-ZK  | 39,20 ± 0,21 | 5,42 ± 0,02 | 18,36 ± 0,05 | 15,52 ± 0,21 |

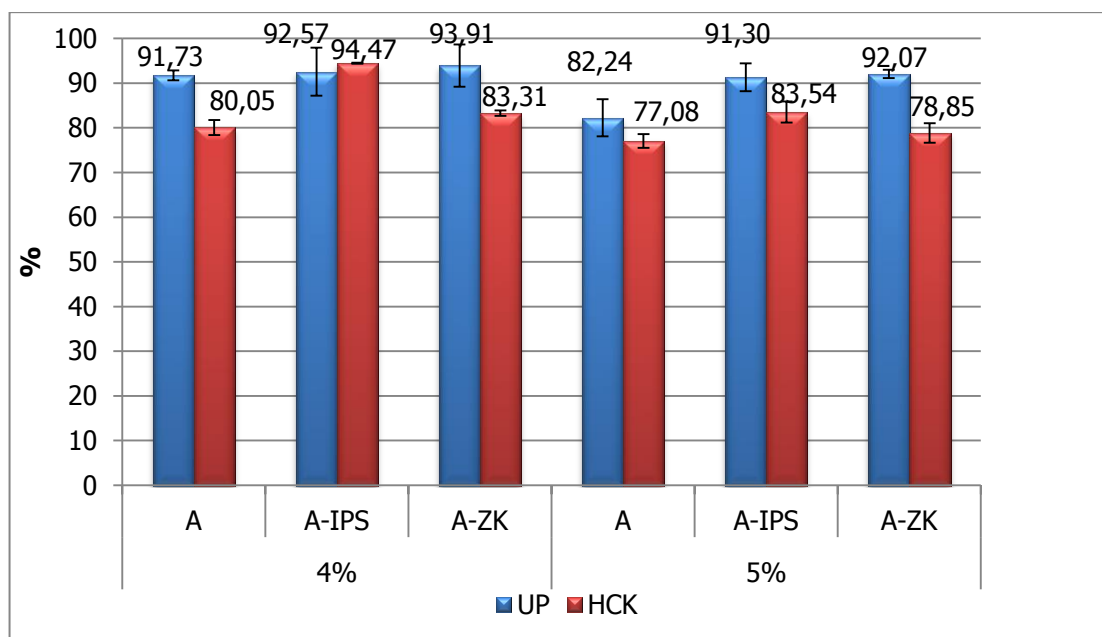
Hidrogel česticama pripremljenim s različitom koncentracijom alginata i različitim sastavom nosača za inkapsulaciju polifenola ružmarina izmjereni su parametri boje u SCI (eng. „*Specular Component Included*“) modu. Izmjerene su vrijednosti  $L^*$  (svjetlina),  $a^*$  (parametar boje ispitivanog uzorka – crveno) i  $b^*$  (parametar boje ispitivanog uzorka – žuto) te je česticama „pojačanim“ s IPS i ZK izračunata i ukupna promjena boje  $\Delta E^*$  računata u odnosu na referentne čestice, odnosno čestice pripremljene s čistim alginatom (prema formuli u poglavlju 3.2.6.3.). Usporedbom rezultata za vrijednosti svjetline kod obje koncentracije alginata vidljiv je isti trend, pri čemu su čestice pripremljene samo s čistim alginatom bile najsvjetlije ( $L^*$  vrijednost iznosi 52,75 za 4% A i 53,88 za 5% A). Binarni sustavi pripremljeni s IPS i ZK imali su manje  $L^*$  vrijednosti, odnosno ti uzorci su bili tamniji, s  $L^*$  vrijednostima od 39,20 do 49,47. Ovakvi rezultati vidljivi su i na slikama 5 i 6. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su hidrogel čestice pripremljene s većom koncentracijom alginata (5%) bile svjetlije u odnosu na čestice pripremljene s 4% A, osim u slučaju sustava A-ZK gdje je vidljiv obrnuti trend.

Vrijednosti za parametar boje  $a^*$ , koji upućuje na izraženije crveno obojenje kod obje koncentracije alginata bile su najveće kod sustava A-ZK (4%-5,51; 5%-5,42), dok su najmanje vrijednosti imali sustavi s čistim alginatom (4% A-1,98; 5% A-1,93). Vrijednosti za parametar boje  $b^*$  koje upućuju na izraženije žuto obojenje bile su najmanje kod uzoraka sa

zelenom kavom, a najveće kod uzoraka pripremljenih samo s alginatom, također za obje koncentracije alginata.

Najveća ukupna promjena boje  $\Delta E^*$  detektirana je kod uzoraka pripremljenih sa zelenom kavom za obje koncentracije alginata. Ukupna promjena boje bila je izraženija kod uzoraka pripremljenih s većom koncentracijom alginata.

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



**Slika 7.** Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) i hidroksicimetnih kiselina (HCK) u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

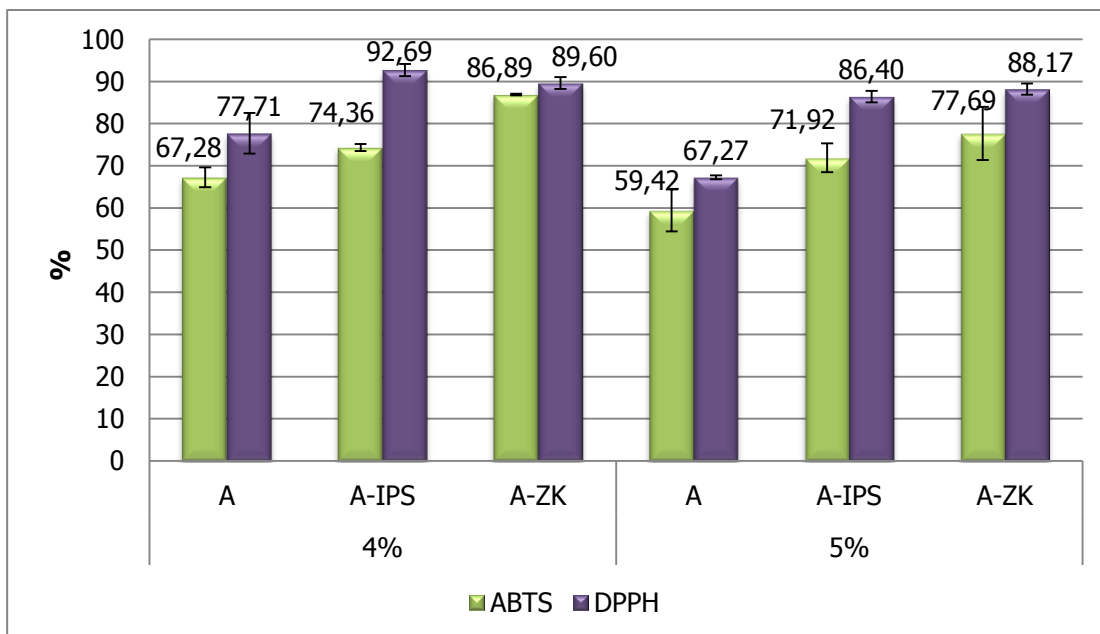
Slika 7 prikazuje inkapsulacijsku učinkovitost (%) ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina pripremljenim ionskim geliranjem ovisno o koncentraciji alginata i sastavu nosača za inkapsulaciju. Usporedbom dobivenih rezultata veću inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola pokazali su sustavi u kojima je korištena manja koncentracija alginata (4%). Kod obje koncentracije alginata, najnižu inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola imao je sustav pripremljen s čistim alginatom, dok je dodatak pomoćnih nosača, poput izolata proteina sirutke i zelene kave, poboljšao inkapsulacijsku učinkovitost te omogućio učinkovitije zadržavanje ukupnih polifenola unutar mreže alginatnog gela. Dodatak zelene kave u polisaharidni omotač rezultirao je najvećim stupnjem inkapsulacije ukupnih polifenola kod

obje koncentracije alginata (4% A - 93,91%; 5% A - 92,07%), pri čemu dobiveni rezultati ukazuju na visok potencijal zelene kave kao dodatnog materijala u sustavu nosača za inkapsulaciju polifenolnih spojeva. Dodatak IPS-a u polisaharidni omotač također je rezultirao visokim stupnjem inkapsulacije ukupnih polifenola kod obje koncentracije alginata (4%-92,57%; 5%-91,30%).

Povećanje inkapsulacijske učinkovitosti „jačanjem“ alginatnog gela, odnosno dodatkom pomoćnih materijala u sustave nosača za inkapsulaciju u skladu je i s drugim istraživanjima. Chen i suradnici (2007) u istraživanju su također koristili alginat kombiniran s proteinima sirutke za imobilizaciju riboflavina te su utvrdili bolju inkapsulacijsku učinkovitost u odnosu na čisti alginat. Déat-Lainé i suradnici (2012) također su potvrdili da se veća inkapsulacijska učinkovitost, u ovom slučaju inzulina, može postići korištenjem alginata u kombinaciji s izolatima proteinima sirutke, u odnosu na mikročestice formulirane pomoću čistog alginata. U istraživanju Bušić i suradnika (2016) dodatak zeina, proteina kukuruza, u alginatni sustav poboljšao je inkapsulacijsku učinkovitost polifenola medicinske gljive *Ganoderma lucidum*.

Usporedbom rezultata za veličinu čestica i inkapsulacijsku učinkovitost vidljiv je proporcionalan odnos između veličine čestica i inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola, gdje su najveće čestice (formirane s A-ZK) imale najveću inkapsulacijsku učinkovitost, što je u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju Bušić i suradnika (2016).

Na slici 7 također je prikazana učinkovitost inkapsulacije hidroksicimetnih kiselina u sustave različitih nosača na bazi alginata. Isti trend, kao i kod ukupnih polifenola, vidljiv je i kod hidroksicimetnih kiselina, gdje je niža koncentracija alginata rezultirala boljom inkapsulacijskom učinkovitošću. Najmanju inkapsulacijsku učinkovitost hidroksicimetnih kiselina, kod obje koncentracije alginata, imao je sustav pripremljen s čistim alginatom. Dodatak pomoćnih materijala poput IPS i ZK, neovisno o koncentraciji alginata, rezultirao je učinkovitijom inkapsulacijom hidroksicimetnih kiselina unutar formiranih sustava. Najveću inkapsulacijsku učinkovitost hidroksicimetnih kiselina pokazao je sustav A-IPS (4% - 94,47%; 5% - 83,54%). Zahvaljujući visokom afinitetu polifenola prema proteinima i interakcijama koje se mogu pojaviti između proteina i polisaharida moguće je stvaranje kompleksa protein-polifenoli i protein-polisaharid, što na kraju može rezultirati uspješnom kemijskom ugradnjom polifenola u takve sustave nosača (Bušić i sur., 2016; Belščak-Cvitanović i sur., 2016).

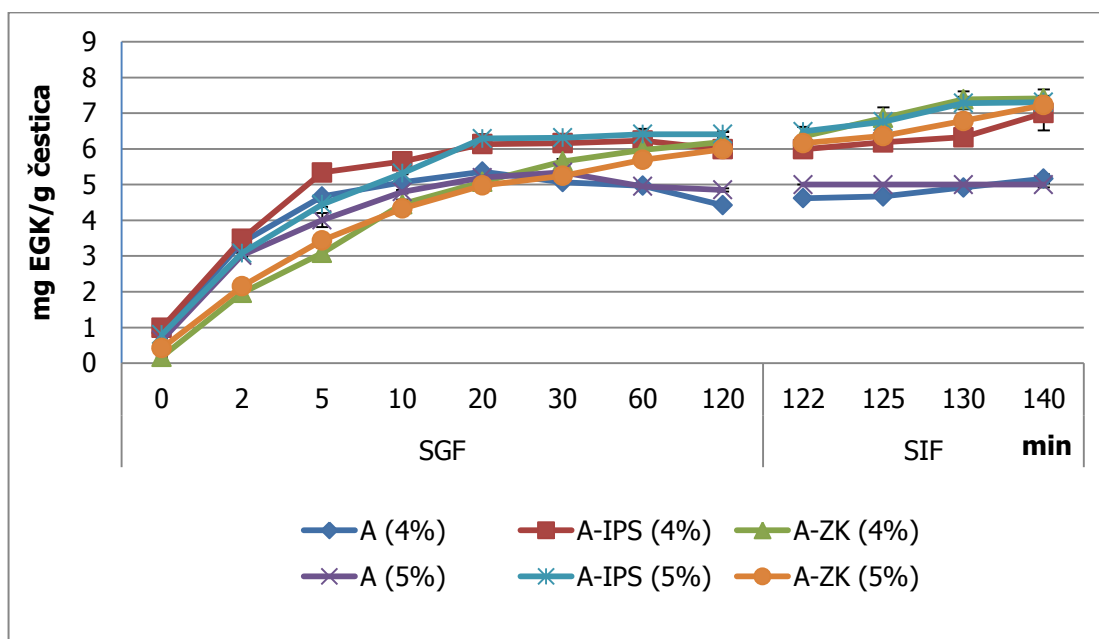


**Slika 8.** Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

Iz grafičkog prikaza na slici 7, za učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode vidljiv je isti trend kao i kod inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina. Dodatak pomoćnih materijala u alginatni sustav povećao je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta kod obje koncentracije alginata, odnosno binarni sustavi nosača (A-IPS i A-ZK) imali su veću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta. Isto tako vidljivo je da je upotreba manje koncentracije alginata (4% A) rezultirala većom sposobnosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta. Najveću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode, kod obje koncentracije alginata, imao je sustav A-ZK (4% - 86,89%; 5% - 77,69%), što dobro korelira s rezultatima dobivenim za inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola. Primjenom DPPH metode najveću učinkovitost pokazao je sustav A-IPS u kojem je korištena 4%-tna koncentracija alginata (92,69%), dok je kod 5%-tne koncentracije alginata najveću učinkovitost imao sustav A-ZK (88,17%).



#### 4.5. Profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina

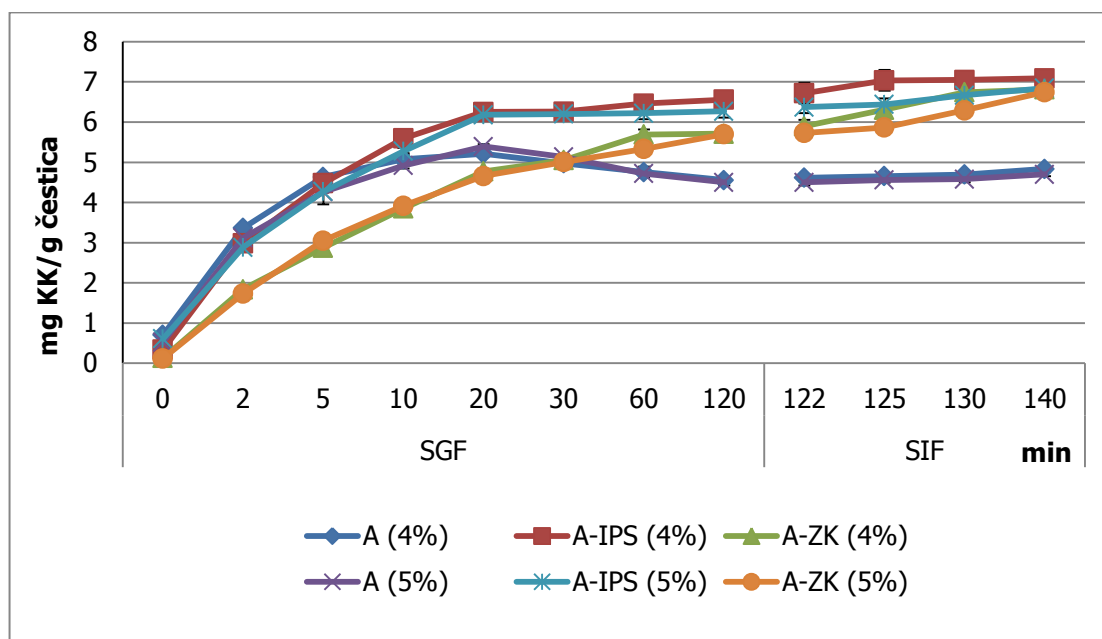


**Slika 9.** Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg EKG/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u SGF i SIF fluidima

Na slici 9 prikazan je profil otpuštanja ukupnih polifenola iz alginatnih hidrogelova u simuliranom gastričnom (SGF) i intestinalnom (SIF) fluidu.

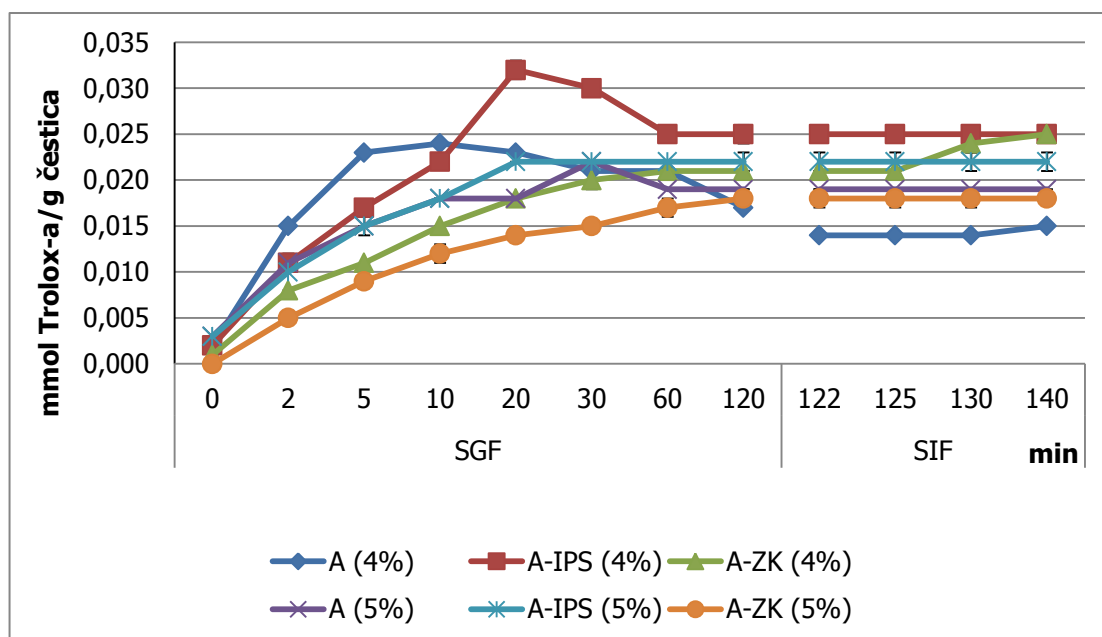
Prilikom usporedbe čistih alginatnih čestica i alginatnih čestica „pojačanih“ s IPS i ZK, neovisno o upotrebljenoj koncentraciji alginata, primjećeno je znatno usporeno otpuštanje ukupnih polifenola iz formiranih čestica kod binarnih sustava. U slučaju čistih alginatnih hidrogelova kod obje koncentracije alginata kontinuirano otpuštanje polifenola odvijalo se do 20. minute, nakon čega je postignuto ravnotežno stanje uz neznatne fluktuacije. Dodatak IPS-a je značajno poboljšao profil otpuštanja ukupnih polifenola, osobito prilikom korištenja 5%-tne koncentracije alginata, gdje je bilo vidljivo kontinuirano otpuštanje ukupnih polifenola kroz 60. minuta u SGF-u, uz nastavak otpuštanja ukupnih polifenola nakon prebacivanja čestica u SIF do 140. minute. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Bušić i suradnika (2016), gdje je također dobiven poboljšani profil otpuštanja polifenola gljive *Ganoderme lucidum* dodatkom izolata proteina sirutke u alginatni gel, što pokazuje učinkovitost proteina kod smanjenja poroznosti alginata. Najbolji profil otpuštanja kod obje koncentracije alginata pokazao je sustav A-ZK, gdje je otpuštanje polifenola bilo kontinuirano

kroz svih 140. minuta u simuliranom gastrointestinalnom sustavu, s udjelom od 7,414 mg EGK/g čestica (za 4%-tni A) i 7,227 mg EGK/g čestica (za 5%-tni A).



**Slika10.** Profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (mg KK/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u SGF i SIF fluidima

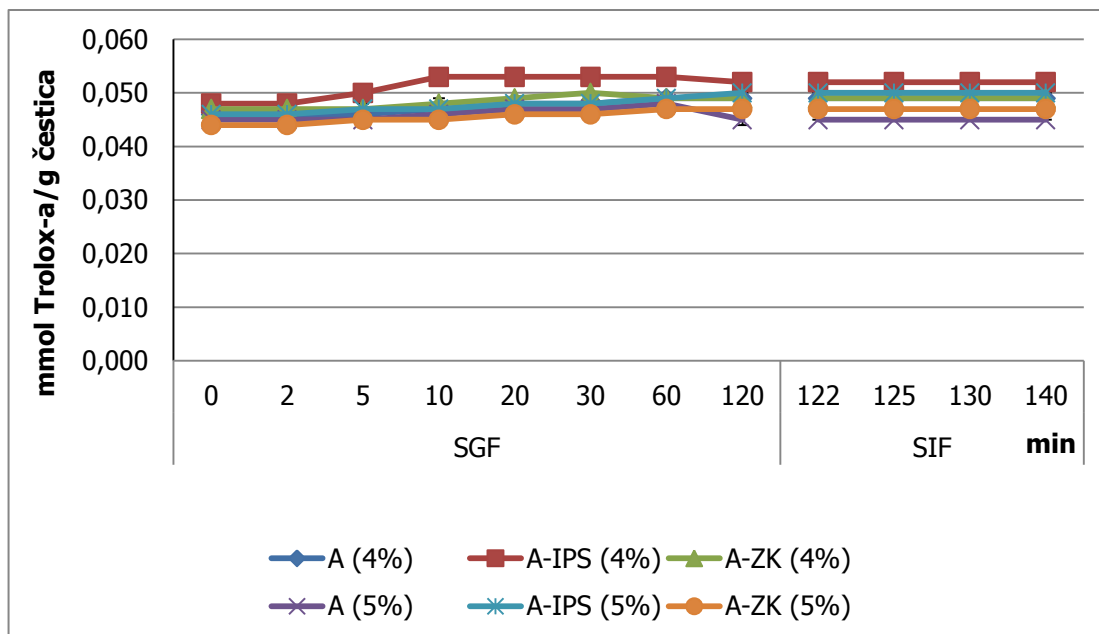
Profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz formuliranih hidrogel čestica prikazan je na slici 10. I ovdje, kao i kod ukupnih polifenola, hidroksicimetne kiseline najbrže se otpuštaju iz čistih alginatnih sustava pripremljenih s obje koncentracije alginata. Kod tih sustava profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz čistih alginatnih čestica je gotovo isti, pri čemu je u oba slučaja zamijećeno kontinuirano otpuštanje kroz 20. minuta SGF-a, nakon čega se uspostavi ravnotežno stanje, a nakon prebacivanja čestica u SIF opet se postiže kontinuirano otpuštanje čestica. „Jačanje” alginata dodatkom izolata proteina sirutke i zelene kave dovelo je do produženog otpuštanja hidroksicimetnih kiselina iz čestica, gdje se hidroksicimetne kiseline iz sustava A-IPS i A-ZK kontinuirano otpuštaju kroz svih 140. minuta SGF-a i SIF-a. Poboljšani profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina (klorogenske kiseline) iz „pojačanih” alginatnih čestica sa škrobom tapioke, primjećeno je i kod Lozano-Vasqueza i suradnika (2015), što je u skladu s rezultatima ovog rada.



**Slika 11.** Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u SGF i SIF fluidima primjenom ABTS metode

Otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima primjenom ABTS metode prikazano je na slici 11.

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da se antioksidacijski kapacitet iz 4%-tnih čistih alginatnih čestica kontinuirano otpuštao do 10. minute u SGF-u, dok se kod čistih alginatnih čestica s 5% A otpuštao do 30. minute u SGF-u, nakon čega je uspostavljeno ravnotežno stanje u intestinalnom fluidu. Sustav A-IPS kod obje koncentracije alginata pokazuje kontinuirano otpuštanje do 20. minute u SGF-u, a nakon toga tijekom vremena se uspostavi ravnotežno stanje. Najbolji profil otpuštanja pokazao je sustav A-ZK (4% A), kod kojeg je zamijećeno kontinuirano otpuštanje u gastričnom fluidu, a nakon prebacivanja u intestinalni fluid postiže se kratko ravnotežno stanje do 125. minute nakon čega se antioksidacijski kapacitet ponovno kontinuirano otpušta do 140. minute (0,025 mmol Trolox-a/g čestica). Sustav A-ZK pripremljen s 5 %-tnom koncentracijom alginata pokazao je kontinuirano otpuštanje u gastričnom fluidu kroz 120. minuta, dok je u intestinalnom fluidu uspostavljeno ravnotežno stanje.



**Slika 12.** Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ružmarina u SGF i SIF fluidima primjenom DPPH metode

Kod DPPH metode otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica odvija se vrlo brzo kod svih sustava, uz vrlo brzo postizanje ravnotežnog stanja (neovisno o koncentraciji alginata). Samo kod sustava A-IPS pripremljenog s 5% A zamijećeno je neznatno kontinuirano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogelova u gastričnom fluidu. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Bušić i suradnika (2016), gdje se također otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čistih alginatnih čestica i alginatnih čestica u sustavu sa zeinom odvijalo vrlo brzo uz postizanje ravnotežnog stanja, dok je alginatni sustav „pojačan“ s izolatima proteina sirutke također pokazao najsporiji profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta.

#### 4.6. Usporedba povećanja mase liofiliziranih čestica nakon vezanja vode

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

| Noslač       | 4%A                 |                  |                  |                  |                  |                   |
|--------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
|              | SR <sub>30min</sub> | SR <sub>1h</sub> | SR <sub>2h</sub> | SR <sub>4h</sub> | SR <sub>6h</sub> | SR <sub>24h</sub> |
| <b>A</b>     | 2,157 ± 0,061       | 2,170 ± 0,020    | 2,194 ± 0,076    | 2,230 ± 0,055    | 2,249 ± 0,011    | 2,264 ± 0,038     |
| <b>A-IPS</b> | 2,538 ± 0,099       | 2,595 ± 0,172    | 2,595 ± 0,203    | 2,769 ± 0,188    | 2,737 ± 0,167    | 2,957 ± 0,257     |
| <b>A-ZK</b>  | 2,468 ± 0,048       | 2,589 ± 0,020    | 2,635 ± 0,043    | 2,8 ± 0,016      | 2,841 ± 0,008    | 2,954 ± 0,014     |
| Noslač       | 5%A                 |                  |                  |                  |                  |                   |
|              | SR <sub>30min</sub> | SR <sub>1h</sub> | SR <sub>2h</sub> | SR <sub>4h</sub> | SR <sub>6h</sub> | SR <sub>24h</sub> |
| <b>A</b>     | 2,470 ± 0,047       | 2,579 ± 0,050    | 2,600 ± 0,038    | 2,681 ± 0,045    | 2,705 ± 0,019    | 2,768 ± 0,026     |
| <b>A-IPS</b> | 2,407 ± 0,021       | 2,630 ± 0,078    | 2,594 ± 0,046    | 2,628 ± 0,024    | 2,740 ± 0,074    | 2,841 ± 0,049     |
| <b>A-ZK</b>  | 2,434 ± 0,011       | 2,527 ± 0,036    | 2,595 ± 0,003    | 2,693 ± 0,023    | 2,724 ± 0,033    | 3,119 ± 0,019     |

SR\*-Swelling ratio, omjer bubrenja mase

U tablici 6 prikazan je omjer povećanja mase liofiliziranih čestica uslijed bubrenja (vezanja vode), pri čemu je kod svih promatranih sustava vidljivo povećanje omjera mase tijekom vremena.

Prema dobivenim rezultatima za sustave pripravljene s 4%-tnim alginatom, najveće povećanje mase vidljivo je kod binarnih sustava A-ZK (SR<sub>24h</sub>=2,954) i A-IPS (SR<sub>24h</sub>=2,957), dok su najmanje povećanje mase pokazale čiste alginatne čestice (SR<sub>24h</sub>=2,264). Kod sustava pripremljenih s 5%-tnim alginatom najveće povećanje mase vidljivo je kod sustava A-ZK (SR<sub>24h</sub>=3,119), a najmanje povećanje mase primijećeno je kod čistih alginatnih čestica (SR<sub>24h</sub>=2,768), kao i kod uzoraka pripremljenih s 4%-tnom koncentracijom alginata.

Dobiveni rezultati ukazuju da, neovisno o koncentraciji alginata, veći kapacitet bubrenja nakon 24 h u vodenom mediju imaju čestice „pojačane” s IPS i ZK. Također, veći Swelling ratio nakon 24 h pokazale su čestice pripravljene s većom koncentracijom alginata (5%), uz iznimku sustava A-IPS. Navedeni rezultati u skladu su s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2015), u kojem su čestice s inkapsuliranim kafeinom formulirane korištenjem alginata u kombinaciji s drugim biopolimerima (mješavinom *Psyllium* ljuskica, pektinom i karagenanom) također pokazale veću sposobnost bubrenja u odnosu na čestice pripravljene s čistim alginatom.

Usporedbom rezultata dobivenih za veličinu čestica i omjer povećanja mase uslijed vezanja vode kod inkapsuliranih sustava primijećen je proporcionalan odnos, budući da su najveće čestice (sustav A-ZK), kod obje koncentracije alginata, imale najveći afinitet vezanja vode.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak izolata proteina sirutke i zelene kave u alginatni matriks gela rezultirao je smanjenjem udjela vode u hidrogel česticama.
2. Veća koncentracija alginata (5%) rezultirala je većom veličinom hidrogel čestica te povećanjem tvrdoće i elastičnosti čestica. „Jačanje“ alginata dodatkom izolata proteina sirutke i zelene kave rezultiralo je smanjenjem tvrdoće i elastičnosti čestica.
3. Čestice pripremljene s čistim alginatom (obje koncentracije) imale su najpravilniji oblik te su pokazale visoku sferičnost. Dodatak dodatnih materijala u alginatni gel rezultirao je promjenom morfoloških karakteristika te smanjenom sferičnosti čestica, pri čemu je dodatak zelene kave rezultirao najlošijim morfološkim karakteristikama.
4. Binarni sustavi bili su tamniji u odnosu na sustave pripremljene samo s alginatom, neovisno o koncentraciji alginata. Hidrogel čestice pripremljene s 5% alginata bile su svjetlije u odnosu na čestice pripremljene s 4% alginata, osim u slučaju sustava A-ZK. Najveća ukupna promjena boje, u odnosu na čiste alginatne čestice, bila je kod čestica formuliranih s alginatom i zelenom kavom (A-ZK).
5. Dodatak izolata proteina sirutke i zelene kave u alginatni sustav rezultirao je povećanjem učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te povećanjem stupnja zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta. Upotreba manje koncentracije alginata (4%) rezultirala je većim stupnjem inkapsulacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te većom sposobnošću zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta.
6. Najbolju učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola imao je alginatni sustav u kombinaciji sa zelenom kavom (93,91% - 4% i 92,07% - 5%), pri čemu je zelena kava kao novi materijal u sustavu nosača pokazala velik potencijal za imobilizaciju polifenola.
7. Alginatne čestice „pojačane“ izolatima proteina sirutke i zelenom kavom imale su sporiji profil otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima u usporedbi s čistim alginatnim česticama, pri čemu je najsporiji profil otpuštanja imao sustav pripremljen sa zelenom kavom.
8. Kod svih sustava na bazi alginata vidljivo je povećanje omjera mase u vodenom mediju tijekom vremena. Neovisno o koncentraciji alginata, binarni sustavi pokazali su veći omjer povećanja mase uslijed vezanja vode u liofiliziranim česticama nakon 24 h.

## 6. LITERATURA

Al-Rousan T., Masad E., Tutumluer E., Pan T. (2007) Evaluation of image analysis techniques for quantifying aggregate shape characteristics. *Construction and Building Materials* **21**: 978 - 990.

Almela L., Sanchez-Munoz B., Fernandez-Lopez J. A., Roca M. J., Rabe V. (2006) Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A* **1120**: 221 - 229.

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

Augustin M. A. (2003) The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Australian Journal of Dairy Technology* **58(2)**: 156 - 160.

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

Bele A. A., Jadhav V. M., Kadam V. J. (2010) Potential of tannins: a review *Asian Journal of Plant Sciences* **9**: 209 - 214.

Belščak-Cvitanović A., Bušić A., Barišić L., Vrsaljko D., Karlović S., Špoljarić I., Vojvodić A., Mršić G., Komes D. (2016) Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids* **57**: 139 - 152.

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

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

Benichou A., Aserin A., Garti N. (2002) Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* **23(1-3)**: 93 - 123.

- Bezbradica D., Matić G., Nedović V., Čukalović-Leskošek I., Bugarski B. (2004) Immobilization of brewing yeast in PVA/alginate microbeads using electrostatic droplet generation. *Chemical Industry* **58**: 118 - 120.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **28**: 25 - 30.
- Bušić A., Belščak-Cvitanović A., Wang Y., Vojvodić A., Karlović S., Špoljarić I., Mršić G., Veršec P., Vučilovski J., Komes D. (2016) Application of whey protein isolates and zein for the formulation of alginate-based delivery systems encapsulating *Ganoderma lucidum* polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **8(2)**: 99 - 106.
- Çam M., Içyer N. C., Erdogan F. (2014) Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT Food Science and Technology* **55**: 117 - 123.
- Chatterjee D., Bhattacharjee P. (2013) Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: shelf-life and frying stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering* **117**: 545 - 550.
- Chen L., Subirade M. (2007) Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **65(3)**: 354 - 362.
- Cuvelier M. E., Richard H., Berset C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**: 645 - 652.
- Davidov-Pardo G, McClements D. J. (2015) Nutraceutical delivery systems: resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry* **167**: 205 - 212.
- Déat-Lainé E., Hoffart V., Garrait G., Beyssac E. (2013) Whey protein and alginate hydrogel microparticles for insulin intestinal absorption: evaluation of permeability enhancement properties on Caco-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics* **453**: 336 - 342.
- Desai K. G. H., Park H. J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **23**: 1361 - 1394.



- Devi N., Sarmah M., Khatun B., Tarun K. M., (2016) Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Colloid and Interface Science* **239**: 136 - 145.
- Donati I., Paoletti S. (2009) Material Properties of Alginates. U: *Alginates: Biology and Applications*, Rehm H.A.B., ur., Springer-Verlag. str. 1 - 54.
- Đorđević V., Balanč B., Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V. (2014) Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews* **7**: 452 - 490.
- Endlein E., Peleikis K.H. (2011) Natural waxes-properties, compositions and applications. *SOFW-Journal*: **137**: 16 - 26.
- Fadel H. H. M., El-Massry K. F. (2000) *Rosmarinus officinalis* L.: effect of drying on the volatile oil of fresh leaves and antioxidant activity of their extracts. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **3**: 5 - 19.
- Fechner C., Knoth A., Scherze I., Muschiolik G. (2007) Stability and release of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids* **21**: 943 - 951.
- Gasperini L., Mano J. F., Reis R. L. (2014) Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of The Royal Society Interface* **11**: 20140817.
- Gogova M., Karles G.D., Kobal G., Mishra M.K., Mishra M. (2014) Application of Encapsulated Capsaicin and Analogues there of for Controlling Calorie Intake. WO2014159884-A1.
- Goh C. H., Heng P. W. S., Chan L.W. (2012) Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers* **88**: 1 - 12.
- Goodship V., Jacobs D. (2009) Polyvinyl alcohol: materials, processing and applications, *Rapra Review Report* **192**: 3 - 23.
- Gökmen V., Sügüt I. (2007) Computer-vision Based Analysis of Colour as a Tool for Food Process Control. U: *Focus on Food Engineering Research and Development*, Pletney V. N., ur., Nova Publishers. str. 17 - 27.
- Jimenez M., Garcia H. S., Beristain C. I. (2008) Sensory evaluation of dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid (CLA). *LWT Food Science and Technology* **41**: 1047 - 1052.

- Karakurum Göskel B., Coskun O., Ucler S., Karatas M., Ozge A., Ozkan S. (2014) Use of complementary and alternative medicine by a sample of Turkish primary headache patients. *Revista de Agricultura* **26(1)**: 1 - 7.
- Lalou S., Mantzouridou F., Paraskevopoulou A., Bugarski B., Levic S., Nedovic V. (2013) Bioflavour production from orange peel hydrolysate using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 9397 - 9407.
- Livney Y.D. (2010) Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **15**: 73 - 83.
- Lorenzi H., de Abreu Matos F. J. (2006) *Rosmarinus officinalis* L. U: Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas, 1. izd., Instituto Plantarum de Estudos da Flora. str. 261 - 263.
- Lozano-Vazquez G., Lobato-Calleros C., Escalona-Buendia H., Chavez G., Alvarez-Ramirez J., Vernon-Carter E. J. (2015) Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. *Food Hydrocolloids* **48**: 301 - 311.
- Malmo C., Storia A. L., Mauriello G. (2013) Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate souffle. *Food and Bioprocess Technology* **6**: 795 - 805.
- Marin M., Koko V., Duletić-Laušević A., Marin P.D., Rančić D., Dajic-Stevanovic Z. (2006) Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany* **72**: 378 - 382.
- Matkowski A., Tasarz P., Szypuła E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research* **2**: 321 - 330.
- McClements D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. 2.izd., CRC Press. str. 238.
- McClements D. J., Decker E. A., Park Y., Weiss J. (2009) Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Food Science and Nutrition* **49(6)**: 577 - 606.

- Mollet B., Lacroix C. (2007) Where biology and technology meet for better nutrition and health. *Current Opinion in Biotechnology* **18**: 154 - 155.
- Munin A., Edwards-Lévy (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review *Pharmaceutics* **3**: 793 - 829.
- Nikolić S., Mojović Lj., Rakin M., Pejin D. (2009) Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel* **88**: 1602 - 1607.
- Norton I. T., Frith W. J. (2001) Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids* **15(4-6)**: 543 - 553.
- Ough C. S., Amerine M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, John Wiley & Sons. Inc. str. 196 - 221
- Parris N., Cooke P. H., Hicks K. B. (2005) Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4788 - 4792.
- Peñuelas J., Munné-Bosch S. (2005) Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science* **10**: 166 - 169.
- Peppas N., Huang Y., Torres-Lugo M., Ward J., Zhang J. (2000) Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2**: 9 - 29.
- Pérez-Chabela M. L., Lara-Labastida R., Rodriguez-Huezo E., Totosaus A. (2013) Effect of spray drying encapsulation of thermotolerant lactic acid bacteria on meat batters properties. *Food and Bioprocess Technology* **6**: 1505 - 1515.
- Petreska-Ivanovska T., Petrushevska-Tozi L., Grozdanov A., Petkovska R., Hadjieva J., Popovski E., Stafilov T., Mladenovska K. (2014) From optimization of synbiotic microparticles prepared by spray-drying to development of new functional carrot juice. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **20(4)**: 549 - 564.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231 - 1237.

- Rocha G. A., Fávaro-Trindade C. S., Ferreira Grosso C. R. (2012) Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing* **90**: 37 - 42.
- Saxena S. K. (2004): Polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Chemical and Technical Assessment (CTA)* **61**: 1 - 5.
- Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., Hardy J. (1998) Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38(8)**: 689 - 753.
- Semo E., Kesselman E., Danino D., Livney Y. D. (2007) Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids* **21**: 936 - 942.
- Shukla R., Cheryan M. (2001) Zein the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* **13**: 171 - 192.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 1179.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology* **299**: 152.
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144 - 158.
- Smith J., Charter E. (2010) Microencapsulation in Functional Food Product Development. U: Functional Food Product Development, 1. izd., Sanguansri L., Augustin M., ur., Wiley-Blackwell. str. 3 - 19.
- Sohail A., Turner M. S., Prabawati E. K., Coombes A. G. A., Bhandari B. (2012) Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *International Journal of Food Microbiology* **157**: 162 - 166.
- Tello F., Falfan-Cortés R. N., Martines-Bustos F., Martins da Silva V., Hubinger Grosso C. (2015) Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloids* **43**: 670 - 678.

- Uludag H., de Vos P., Tresco P. A. (2000) Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **42**: 29 - 64.
- Urbanska A. M., Bhathena J., Prakash S. (2007) Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yoghurt for therapeutic oral delivery: preparation and *in-vitro* analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **85**: 884 - 893.
- Vandamme T. F., Poncelet D., Subra-Paternault P. (2007) Microencapsulation: Des Sciences aux Technologies, 2. izd., Lavoisier Tec & Doc.
- Vladislavljevic G.T. (2012) Encapsulation Techniques. U: Encyclopedia of Membranes, 1. izd., Drioli E., Giorno L., ur., Heidelberg: Springer Reference. str. 11 - 13.
- Wandrey C., Bartkowiak A., Harding S. E. (2010) Materials for Encapsulation. U: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing, 1. izd., Zuidam N. J., Nedovic V. A., ur., Springer. str. 31 - 100.
- Wang Y., Padua G. W. (2012) Nanoscale characterization of zein self- assembly. *Langmuir* **28(5)**: 2429 - 2435.
- Wellwood C. R. L., Cole R. A. (2004) Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 6101 - 6107.
- Wildman R. E. C., Kelley M. (2001) Nutraceuticals and Functional Foods. U: Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, 2. izd., Wildman R.E.C., ur., Taylor and Francis. str. 1 - 22.
- 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, 1. izd., Zuidam N. J., Nedovic V., ur., Springer. str. 3 - 29.

## Izjava o izvornosti

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

Gabrijela Šišić

---

ime i prezime studenta