

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

univ. bacc. ing. agr. Sara Kolar

**Inkapsulacija i otpuštanje prirodnih polifenolnih spojeva iz
multikomponentnih mikročestica hidrogelova**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za kemiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Slavena Jurića te izv. prof. dr. sc. Marka Vinčekovića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS KRATICA

ROS	reaktivni oblici kisika
RNS	reaktivni oblici dušika
UAE	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom
MAE	ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima
PLE	ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom
TPC	ukupan sadržaj polifenola
mg	miligram
g	gram
EKG	ekvivalenta galne kiseline
L	litra
min	minuta
°C	oznaka za temperaturu u stupnjevima Celzijusa
EtOH	etanol
W	vat
mm	milimetar
Hz	herc
kHz	kiloherc
µm	mikrometar
ALG	natrijev alginat
KAZ	kazein kravljeg mlijeka

XGUM	ksantan guma
NaCl	natrijev klorid
CaCl ₂	kalcijev klorid
HCl	klorovodična kiselina
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ × 2H ₂ O	natrijev citrat dihidrat
NaOH	natrijev hidroksid
Na ₂ CO ₃	natrijev karbonat
NaHCO ₃	natrijev hidrogen karbonat
Na ₂ HPO ₄	natrijev hidrogen fosfat
NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	natrijev dihidrogen fosfat dihidrat
g/L	masena koncentracija izražena u gramima po litri
mL	mililitar
w/v	oznaka za volumni udio
nm	nanometar
mol dm ⁻³	oznaka za množinsku koncentraciju (mol po decimetru kubnom)
mBar	milibar
EE	efikasnost inkapsulacije
LC	kapacitet inkapsulacije
ST	suha tvar
S _w	stupanj bubrenja
EDS	elementarna kemijska analiza površine mikročestica energetskim disperzivnim X – spektrom zračenja
SEM	pretražni elektronski mikroskop

M	oznaka za množinsku koncentraciju (molarna)
f	frakcija kumulativne količine otpuštenog TPC
t	oznaka za vrijeme
log	oznaka za logaritamsku vrijednost
H ₂ O	oznaka za deioniziranu vodu
K	kinetička konstanta
n	eksponent oslobodjenja
R ²	koeficijent korelacije

SADRŽAJ

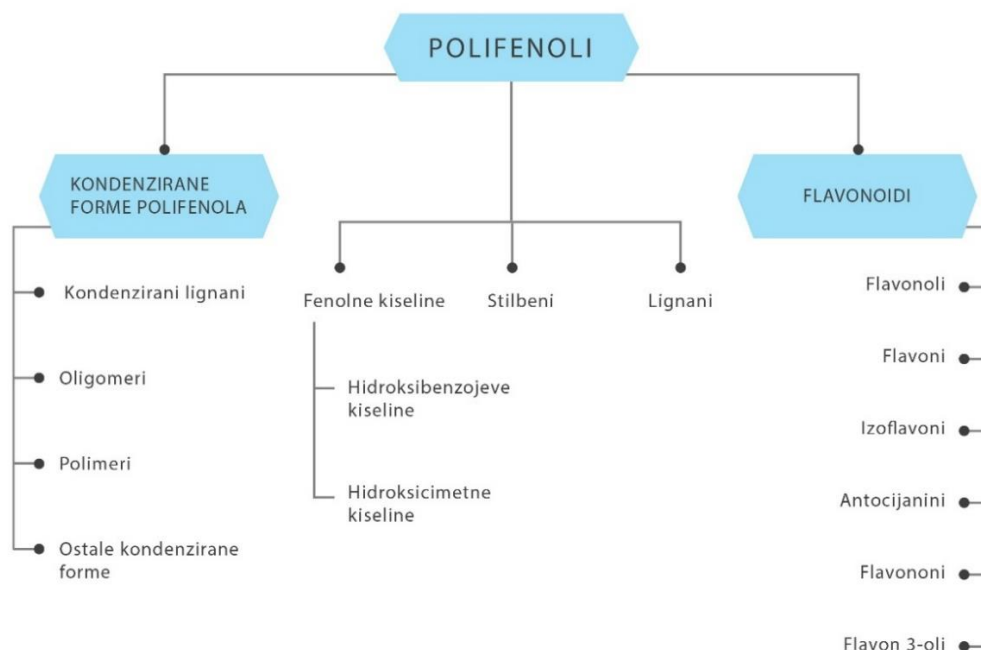
1. UVOD.....	1
1.1. Polifenoli.....	1
1.2. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	5
1.3. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija polifenola iz biljke <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni....	6
1.4. Tehnologija inkapsulacije	12
1.5. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja i svojstva biopolimera (natrijev alginat, kazein i ksantan guma).....	14
2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	17
2.1. Hipoteza	17
2.2. Opći i specifični ciljevi rada	17
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. Materijali.....	19
3.1.1. Biljni materijal	19
3.1.2. Kemikalije.....	19
3.2. Metode	20
3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	20
3.2.2. Priprava mikrosfera.....	24
3.2.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera.....	27
3.2.4. Mikroskopska promatranja	30
3.2.5. <i>In vitro</i> otpuštanje TPC iz formulacija mikročestica	31
3.2.6. Statistička analiza.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni	34
4.2. Fizikalno – kemijska karakterizacija mikrosfera	35
4.2.1. Efikasnost i kapacitet inkapsulacije i suha tvar	35
4.2.2. Stupanj bubrenja	37
4.2.3. Morfologija i veličina mikrosfera	40
4.3. <i>In vitro</i> otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica.....	47
4.3.1. <i>In vitro</i> otpuštanje TPC iz mikročestica u deioniziranoj vodi	47
4.3.2. <i>In vitro</i> otpuštanje TPC iz formulacija mikročestica u otopinama natrijeva klorida ..	51

4.3.3. <i>In vitro</i> otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	53
5. RASPRAVA	65
5.1. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni	65
5.2. Fizikalno – kemijska karakterizacija mikrosfera	67
5.2.1. Efikasnost i kapacitet inkapsulacije i suha tvar	67
5.2.2. Stupanj bubrenja	68
5.2.3. Morfologija i veličina mikrosfera	69
5.3 <i>In vitro</i> otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica.....	71
5.3.1. <i>In vitro</i> otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u deioniziranoj vodi	72
5.3.2. <i>In vitro</i> otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u otopinama natrijeva klorida	72
5.3.3. <i>In vitro</i> otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.....	73
6. ZAKLJUČCI.....	75
7. ZAHVALE.....	77
8. POPIS LITERATURE	78
9. SAŽETAK	90
10. SUMMARY	92
ŽIVOTOPIS AUTORA	94

1. UVOD

1.1. Polifenoli

Polifenoli, sekundarni biljni metaboliti koji se nalaze u sjemenkama, plodovima i lišću, dobro su poznati po svojim antioksidativnim svojstvima i prevenciji karcinoma, kardiovaskularnih te neurodegenerativnih bolesti (Cordova i Watson, 2014; Martínez i sur., 2014; Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Izraz „polifenoli“ označava polifenolne strukture s nekoliko aromatskih prstena koje na sebi nose nekoliko hidroksilnih skupina, ali i molekule s jednim fenolnim prstenom (fenolna kiselina i fenolni alkohol) (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Danas je poznato više od 8 000 polifenola (Cordova i Watson, 2014; Belščak-Cvitanović i sur., 2018) te se s obzirom na strukturu dijele na: flavonoide, kondenzirane forme polifenola te zasebnu skupinu kojoj pripadaju fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Slika 1.).

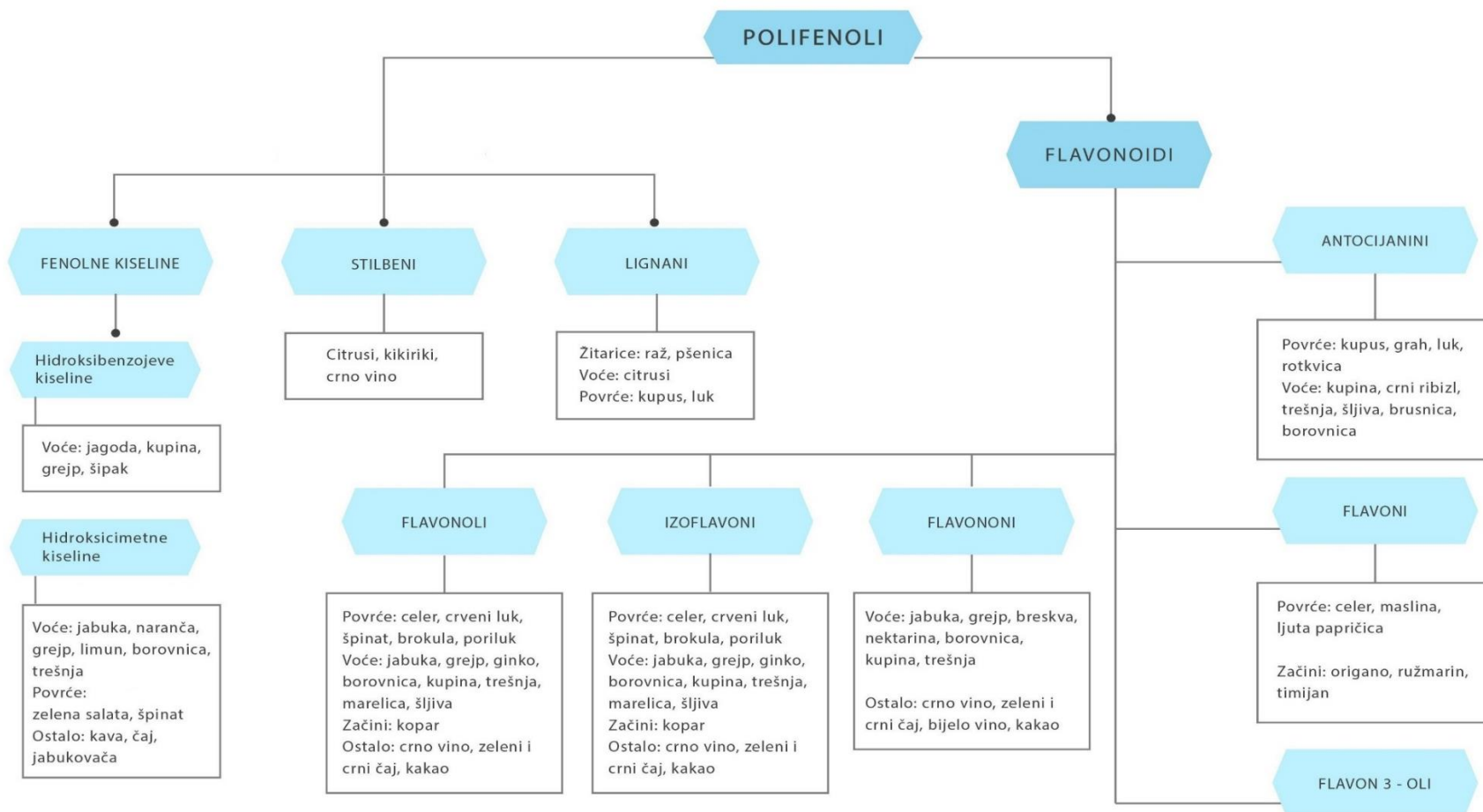


Slika 1. Shematski prikaz podjele polifenola s obzirom na strukturu (Fuss, 2003; Chong i sur., 2009; Stalikas, 2010).

Obolijevanje od malignih, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti velikim dijelom uzrokovano je oksidativnim stresom (Schieber i Chandel, 2014). Oksidativan stres je stanje povećane razine reaktivnih oblika kisika (ROS) i reaktivnih oblika dušika (RNS) i/ili deficijencije antioksidansa u organizmu što dovodi do disbalansa oksidacijsko - redukcijske ravnoteže i pomaka u smjeru oksidacije (Valko i sur., 2007; Schieber i Chandel, 2014). Rezultat pomaka ravnoteže u smjeru oksidacije je nakupljanje radikala, tj. molekula ili dijelova molekula koje u valentnoj ljusci sadrže jedan ili više nesparenih elektrona zbog čega su vrlo reaktivni i uzrokuju oštećenja na razini stanica i tkiva (Valko i sur., 2007; Schieber i Chandel, 2014). Prevencija oksidativnog stresa temelji se na unosu dostatne količine antioksidansa, tj. tvari koje neutraliziraju slobodne radikale doniranjem jednog ili više elektrona (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

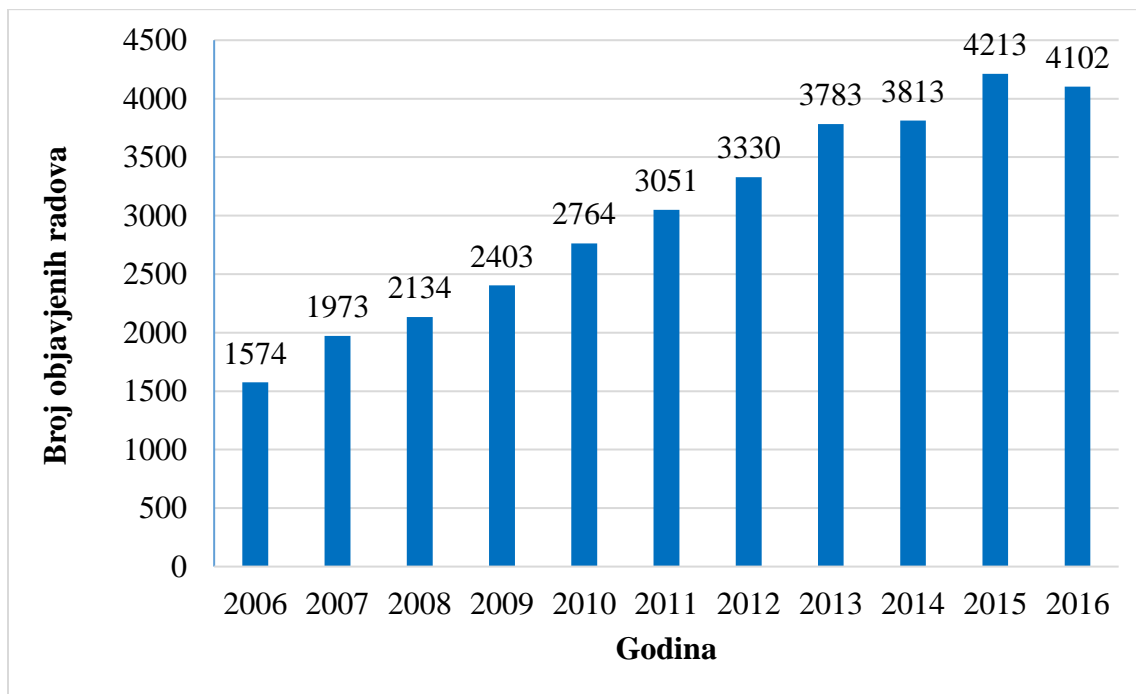
Polifenoli su najzastupljeniji antioksidansi u hrani (Cvejić Hogervorst i sur., 2018) i pokazuju sinergističko djelovanje s vitaminima A, C i E u zaštiti zdravlja (Nowak i sur., 2014). Radi velikog interesa u pronalaženju kemopreventivnih tvari, mnogobrojna istraživanja pokazala su da polifenoli (u određenoj mjeri) uništavaju tumorske stanice (Doo i Maskarinec, 2014; Nowak i sur., 2014; Nunes i sur., 2018) te se preporučuje njihova implementacija u prehrani tijekom svih stadija tumorogeneze (Cordova i Watson, 2014). Zabilježen je i pozitivan učinak polifenola (u određenoj mjeri) na rekurentnost karcinoma dojke, debelog crijeva i prostate (Cordova i Watson, 2014). Sposobnost polifenola u apsorpiranju ultraljubičastog zračenja djelomično sprječava melanogenezu te različita oštećenja strukture i funkcije kože (Martínez i sur., 2014). U životinjskim modelima istraživani su utjecaji polifenola na epilepsiju te su uočena antiepileptička i neuroprotektivna svojstva resveratrola i katehina (Dhir, 2020).

Rasprostranjenost polifenola u biljkama kvantitativno i kvalitativno je varijabilna (Belščak-Cvitanović i sur., 2018) te ovisi o vrsti biljke, sorti, fitofenološkom stadiju, uvjetima rasta, klimatskim čimbenicima, posliježetvenim postupcima i skladištenju (Nunes i sur., 2018). Određeni polifenoli su široko rasprostranjeni, a drugi restriktivni za određene porodice ili vrste biljaka (Slika 2.). Flavonoidi, najzastupljenija skupina polifenola, pokazuju protuupalna, antialergijska, antivirusna i antikancerogena svojstva (Sindhi i sur., 2013). Prema literaturnim podacima, konzumacijom namirnica bogatim izoflavonima (soja, zeleni čaj) reducira se rizik od osteoporoze (Cvejić Hogervorst i sur., 2018), karcinoma dojke i prostate te kardiovaskularnih bolesti (Nunes i sur., 2018).



Slika 2. Rasprostranjenost polifenola u biljnim vrstama (Manach i sur., 2004; Han i sur., 2007; Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

Polifenoli su jedni od najistraživanijih bioaktivnih komponenti u hrani zbog svoje biodostupnosti, biorazgradljivosti, niske cijene, kompatibilnost s ostalim komponentama te pozitivnog efekta na ljudsko zdravlje (Sindhi i sur., 2013). Prema bazi Web of Science, u razdoblju od 1900. do 2016., objavljeno je ukupno 43 221 znanstvenih i istraživačkih radova, a znatan porast istraživanja i publikacije zapažen je u razdoblju od 2006. do 2016. godine (Slika 3.).



Slika 3. Ukupan broj objavljenih znanstvenih i istraživačkih radova o polifenolima u razdoblju od 2006. do 2016. godine (Web of Science, Adebooye i sur., 2018).

Znanstveni interes za polifenolima popraćen je i kontinuiranim povećanjem proizvodnje polifenola na globalnoj razini (Adebooye i sur., 2018). Ukupna količina industrijski ekstrahiranih polifenola iz biljnih vrsta u 2015. godini iznosila je 16 380 tona, a do kraja 2024. godine očekuje se ukupna proizvodnja u iznosu od 33 880 tona (Adebooye i sur., 2018). Optimalno iskorištenje polifenola ovisi o metodi ekstrakcije, tipu i polarnosti otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije (Ameer i sur., 2017; Adebooye i sur., 2018).

1.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni, nativna biljka Paragvaja, botanički je klasificirana 1899. godine od Moisés Santiago Bertonia (Lemus-Mondaca i sur., 2012), a kemičar Ovidio Rebaudi prvi je analizirao njezin kemijski sastav (Salehi i sur., 2019). Pripada porodici *Asteraceae* i rodu *Stevia* koji obuhvaća oko 230 vrsta, no samo vrstu *Stevia rebaudiana* Bertoni karakterizira sladak okus (Lemus-Mondaca i sur., 2012; Salehi i sur., 2019). Stoljećima su Guarani plemena iz Paragvaja koristila steviju kao prirodni zaslađivač u ljekovitim čajevima za tretiranje želučanih tegoba (Lemus-Mondaca i sur., 2012), a njezina popularizacija započinje primjenom u bezalkoholnom piću Coca-Cola (Šic Žlabur i sur., 2013).

Sladak okus proizlazi iz prisustva glikozida: steviozida, rebaudiozida (A, B, C, D, E, F), izosteviola, steviolbiozida i dulkozida A (Salehi i sur., 2019). Steviol glikozidi su 300 puta slađi od saharoze, termostabilni na temperaturama do 200 °C, bez toksičnih efekata na zdravlje i bez kalorija (Lemus-Mondaca i sur., 2012; Šic Žlabur i sur., 2012, 2013; Salehi i sur., 2019). Prepoznati su kao bakteriostatici i fungistatici koji inhibiraju rast i razvoj mikroorganizama u usnoj šupljini te sudjeluju u sprječavanju nastanka dentalnog karijesa (Salehi i sur., 2019). Pokazuju antihiperглиkemijska svojstva (zbog odsustva kalorija) i sinergističko djelovanje s lijekovima u tretiranju dijabetesa tipa 2 (Salehi i sur., 2019). Osim steviol glikozida, *Stevia rebaudiana* Bertoni odličan je izvor ugljikohidrata, proteina, vlakana i minerala (Šic Žlabur i sur., 2013). Sadrži i polifenole odgovorne za antioksidativna svojstva koji reduciraju rizik od razvitka tumora (Salehi i sur., 2019).

1.3. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija polifenola iz biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni

Velika potražnja za prirodnim proizvodima rezultira pretjeranim i neefikasnim iskorištavanjem biljnih resursa, stvaranjem velike količine biootpada, kontaminacijom tla i vode te velikom potrošnjom energije (Chemat i sur., 2012). Posljednjih nekoliko godina velika se važnost pridodaje prehrani u cilju prevencije bolesti te održavanja psihofizičkog zdravlja implementacijom tzv. „funkcionalne hrane“, tj. hrane bogate bioaktivnim spojevima (Ciulu i sur., 2017). Veliki je interes usmjeren ekstrakciji biljnih metabolita i njihovoj upotrebi kao aditiva u hrani. Zbog antioksidativnih svojstava stevije, koja proizilaze iz prisutnosti polifenola, sve se češće koristi kao dodatak u prehrambenim proizvodima (sokovi, džemovi i sl.) (Periche i sur., 2015).

Prehrambena, farmaceutska i kozmetička industrija teže razvijanju i implementiranju novih, ekološki prihvatljivih metoda ekstrakcije koje bi trebale zamijeniti konvencionalne metode (maceracija i Soxhlet) (Chemat i sur., 2012; Flórez i sur., 2014). „Zelene“ metode ekstrakcije temelje se na nekoliko principa: veći ekstrakcijski prinos i kvaliteta uz intaktnost njegovih svojstava, redukcija potrošnje energije, ekstrakcijskog vremena i otpadnih materijala te zamjena postojećih, petrokemijskih otapala biorazgradljivim i netoksičnim „zelenim“ otapalima (voda, etanol) (Chemat i sur., 2012; Šic Žlabur i sur., 2012; Flórez i sur., 2014; Tiwari, 2015; Ameer i sur., 2017; Carbonell-Capella i sur., 2017; Medina-Torres i sur., 2017). Veliki napredak u optimiziranju i modeliranju postignut je kod ekstrakcije prirodnih spojeva i sekundarnih biljnih metabolita korištenjem ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE), ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) te ekstrakcije potpomognute visokim tlakom (PLE) (Flórez i sur., 2014).

U tablici 1. prikazana su dosadašnja istraživanja ekstrakcije ukupnog sadržaja polifenola (TPC) iz lišća *Stevia rebaudiana* Bertoni (izražen u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu stevije (mg EKG/g stevije)) u ovisnosti o ekstrakcijskoj metodi, koncentraciji uzorka, ekstrakcijskom vremenu i temperaturi, vrsti otapala, snazi (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom) te promjeru sonde (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom).

Tablica 1. Ovisnost TPC-a iz lišća biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni o ekstrakcijskoj metodi, koncentraciji, vrsti otapala, temperaturi, vremenu ekstrakcije, snazi i promjeru sonde.

Metoda ekstrakcije	Parametri ekstrakcije (koncentracija, otapalo, temperatura, vrijeme, snaga, promjer sonde)	TPC (mg EKG/g stevije)	Izvor
	10g/L; voda; 90 °C; 40 min	93,41	Periche i sur., 2015
	2,5 g/L; voda; 100 °C; 60 × 24 min	53,96 ± 0,92	Šic Žlabur i sur., 2015
	2,5 g/L; 70 % EtOH; 70 °C; 30 min	56,72 ± 1,02	
	100 g/L; 50 % EtOH; 75 % EtOH; 25 °C; 720 min	34 ± 2; 36 ± 2	Ciulu i sur., 2017
	100 g/L; 60 % aceton; voda; 60 % EtOH; heksan; 40 °C; 90 min	170; 168,86; 85,91; 45,23	Zaidan i sur., 2018
Maceracija	10,76 g/L; 25 % EtOH; 33 °C; 38 min	54,5	Yilmaz i sur., 2020
	26,32 g/L; 25 % EtOH; 33 °C; 93 min	45,0	
	10,76 g/L; 25 % EtOH; 48 °C; 93 min	58,5	
	15,38 g/L; 50 % EtOH; 40 °C; 65 min	55, 7	
	15,38 g/L; 50 % EtOH; 40 °C; 10 min	52,6	
	8,33 g/L; 50 % EtOH; 40 °C; 65 min	66,0	
	26,32 g/L; 75 % EtOH; 48 °C; 93 min	50,5	
	10,76 g/L; 75 % EtOH; 48 °C; 38 min	57,1	
	10,76 g/L; 75 % EtOH; 33 °C; 93min	59,0	
	15,38 g/L; voda; EtOH; 40 °C; 65min	41,3	

	10 g/L; voda; 50 °C; 1,98 W; 3min	81,0	Periche i sur., 2015
	10 g/L; EtOH; 90 °C; 400 W; 45 min	80,13	Yildiz Ozturk i sur., 2015
	33,33 g/L; voda; 50 % EtOH; do 50 °C; 400 W; 1,2 min	25,3 ± 0,2; 25,7 ± 0,1	Carbonell-Capella i sur., 2017
	100 g/L; voda; 25 % EtOH; 50 % EtOH; 75 % EtOH; 100 % EtOH; 100 °C; 15 min	27 ± 3; 31 ± 2; 39 ± 4; 43 ± 5; 26 ± 2	
Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	100 g/L; 75 % EtOH; 75 °C; 125 °C; 150 °C; 15 min	20 ± 3; 40 ± 7; 38 ± 7	Ciulu i sur., 2017
	100 g/L; 75 % EtOH; 100 °C; 5 min; 10 min; 20 min	39 ± 3; 37 ± 4; 45 ± 6	
	8,47 g/L; 50 % EtOH; 20 °C; 25 °C; 25 °C; 38 °C; 38 °C; 38 °C; 50 °C; 50 °C; 13 min; 5 min; 21 min; 1 min; 13 min; 25 min; 5 min; 21 min; 700 W	51,3; 48,9; 57,0; 55,5; 64,4; 65,3; 62,6; 68,1	Yilmaz i sur., 2020
Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom	363, 63 g/L; voda; 15 % EtOH; 15 % EtOH; 50 % EtOH; 50 % EtOH; 50 % EtOH; 85 % EtOH; 85 % EtOH; 100 % EtOH; 120 °C; 63 °C; 176 °C; 40 °C; 120 °C; 200 °C; 63 °C; 176 °C; 120 °C; 20 min	67 ± 1; 56 ± 2; 55 ± 2; 53 ± 4; 58 ± 4; 79 ± 9; 41 ± 1; 68 ± 4; 28 ± 2	Ciulu i sur., 2017

	10 g/L; voda; 50 °C; 20 min	80	Periche i sur., 2015
	2,5 g/L; voda; do 45,5 °C; 400 W; 2 min; 4 min; 6 min; 8 min; 10 min; 7 mm	24.60 ± 1.39; 35.21 ± 2.16; 51.68 ± 0.82; 56.32 ± 0.29; 59.43 ± 2.11	Šic Žlabur i sur., 2015
	2,5 g/L; voda; do 81,2 °C; 400 W; 2 min; 4 min; 6 min; 8 min; 10 min; 22 mm	30.68 ± 0.37; 38.89 ± 2.77; 75.58 ± 0.43; 76.49 ± 2.14; 77.89 ± 2.28	
Ekstrakcija potpomognuta <u>ultrazvukom</u>	66,67 g/L; EtOH; 90 °C; 45min	86,47	Yildiz-Ozturk i sur., 2015
	33,33 g/L; voda; 50 % EtOH; do 50 °C; 400 W; 1,2 min; 22 mm	25,6 ± 0,1; 23,8 ± 0,1	Carbonell-Capella i sur., 2017
	8,47 g/L; 50 % EtOH; 20 °C; 25 °C; 25 °C; 38 °C; 38 °C; 38 °C; 50 °C; 50 °C; 540 W; 28 min; 12 min; 43 min; 5 min; 28 min; 50 min; 12 min; 43 min	51,3; 47,7; 57,6; 49,7; 60,6; 65,6; 56,3; 68,6	Yilmaz i sur., 2020

Periche i sur. (2015) proučavali su utjecaj metode ekstrakcije (maceracija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima), vremena i temperature na ukupan sadržaj polifenola, a kao otapalo korištena je voda. Korištenjem konvencionalne metode zabilježen je za otprilike 14 % veći ukupan sadržaj polifenola, no pri znatno većoj temperaturi (90 °C) i dužem ekstrakcijskom vremenu (40 minuta) u usporedbi s ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (50 °C i 20 minuta) te ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (50 °C i 3 minute). Istraživanje Yilmaza i sur. (2020) pokazalo je relativno visok ukupan sadržaj polifenola primjenom metode maceracije, ali uz korištenje veće količine otapala što nije ekonomično i ekološki prihvatljivo. Osim o temperaturi i vremenu ekstrakcije, značaj utjecaj na ekstrakciju polifenola ima vrsta otapala. U istraživanju Zaidana i sur. (2018), kod metode maceracije, kao otapala korišteni su voda, 60 % aceton, 60 % etanol (EtOH) te heksan. Značajna razlika u TPC-u između korištenja vode i 60 % acetona nije utvrđena, no značajnije manji rezultati postignuti su korištenjem 60 % etanola i heksana pri istoj temperaturi i vremenu. Zaidan i sur. (2018) navode kako, usprkos visokim ekstrakcijskim prinosima, upotreba određenih organskih otapala (aceton, metanol i sl.) u prehrambenoj industriji nije preporučena zbog njihove toksičnosti.

U mnogobrojnim istraživanjima ekstrakcije ukupnog sadržaja polifenola korišten je etanol (EtOH) kao otapalo te su rezultati, u određenoj mjeri, nekonzistentni. Ciulu i sur. (2017) te Carbonell-Capella i sur. (2017) navode kako, korištenjem otapala različitog udjela etanola kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, postižu se veći iznosi TPC-a u usporedbi s korištenjem vode kao otapala za razliku od istraživanja Yildiz-Ozturka i sur. (2015) koje je pokazalo veće ekstrakcijske prinose polifenola (pri istoj temperaturi i vremenu uz korištenje etanola kao otapala) kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, a ne kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, uz korištenje vode kao otapala, pokazala se efikasnijom u ekstrakcijskim prinosima polifenola u istraživanju Carbonell-Capella i sur. (2017). Ciulu i sur. (2017) također navode veću ekstrakcijsku efikasnost korištenjem vode u ekstrakciji potpomognutoj visokim tlakom (u usporedbi sa 100 %, 15 % i 50 % etanolom pri istoj ili nižoj temperaturi). Povećanje ekstrakcijskih prinosa, korištenjem etanola, postiže se višim temperaturama i dužim vremenom ekstrakcije (Zaidan i sur., 2018) što može rezultirati degradacijom termosenzibilnih spojeva kao što su polifenoli (Šic Žlabur i sur., 2015; Yilmaz i sur., 2020) stoga voda pokazuje najveći potencijal kao otapalo (Zaidan i sur., 2018).

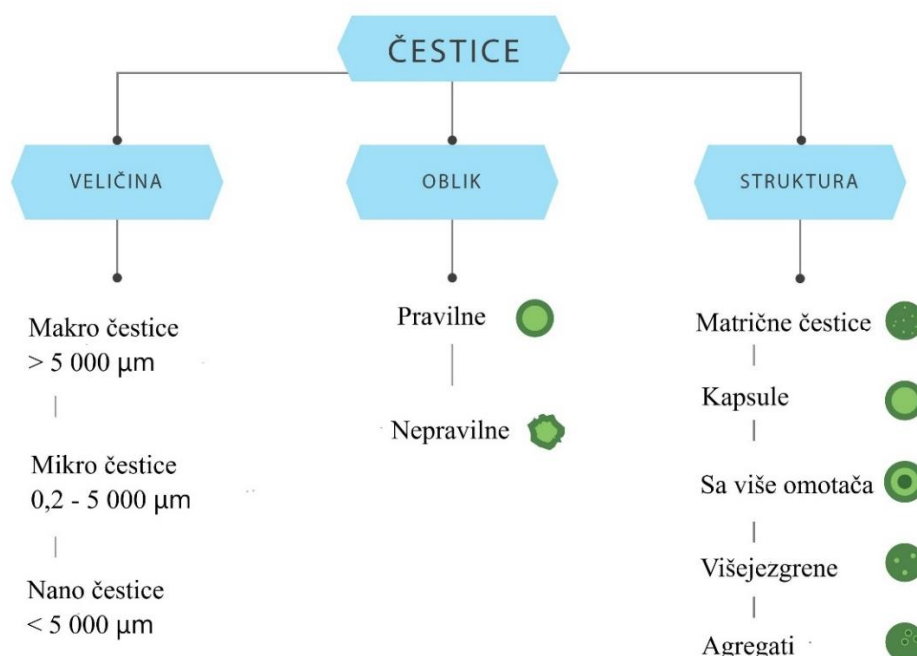
Nekonvencionalne metode ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima) ostvaruju veće ekstrakcijske prinose u kraćem vremenu i pri nižim temperaturama od konvencionalnih metoda (Šic Žlabur i sur., 2015; Ciulu i sur., 2017; Carbonell-Capella i sur., 2017). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) temelji se na djelovanju ultrazvučnih valova (20 - 100kHz) (Drmić i Režek Jambrak, 2010) koji rezultiraju rupturom stanične stijenke i prodiranjem otapala u stanični sadržaj (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Tiwari, 2015). Direktni kontakt otapala sa staničnim sadržajem povećava difuziju i transport mase što rezultira bržom i efikasnijom ekstrakcijom željenih komponenti (Tiwari, 2015). Ekstrakcijski prinos bioaktivnih spojeva ovisi o optimizaciji ultrazvučnih parametara: odabir ultrazvučnog sustava (sonda ili kupelj), frekvencija, amplituda, vrijeme, temperatura, vrsta otapala te vrsta i koncentracija uzorka. (Tiwari, 2015; Medina-Torres i sur., 2017; Kumar i sur., 2020).

Osim navedenih ultrazvučnih parametara, na ekstrakcijski prinos ukupnog sadržaja polifenola utječe i promjer sonde. Šic-Žlabur i sur. (2015) zabilježili su veće ekstrakcijske prinose korištenjem sonde promjera 22 mm u usporedbi sa sondom promjera 7 mm. Ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom postiže se veća ekstrakcijska efikasnost pri nižim temperaturama i u kraćem vremenu, nema evaporacije velike količine otapala te se organska otapala u potpunosti mogu zamijeniti vodom čime se pridonosi zaštiti okoliša (Šic-Žlabur i sur., 2015).

Iako su polifenoli najzastupljeniji antioksidansi u hrani (Rodrigo i Gil-Becerra; 2014), njihov glavni nedostatak je niska biodostupnost. Gessner i sur. (2016) navode kako prosječna biodostupnost polifenola iznosi svega 5 – 10 %, a posljedica je njihove degradacije u želucu, loše apsorpcije u crijevima te brze eliminacije iz tkiva (Manach i sur., 2004). Loša apsorpcija u crijevima rezultat je razgradnje djelovanjem crijevnih enzima ili enzima crijevne mikroflore (Manach i sur., 2004; Abdel-Moneim i sur., 2020). Smanjena biodostupnost proizilazi i iz izlaganja polifenola svjetlosti, oksidaciji tijekom skladištenja te raznim tehnološkim procesima (kuhanje) (Manach i sur., 2004). Povećanje biodostupnosti, zaštita od okolišnih uvjeta te ciljano i kontrolirano otpuštanje polifenola u gastrointestinalnom traktu moguće je postići njihovom inkapsulacijom u čestice obavijene adekvatnim omotačima.

1.4. Tehnologija inkapsulacije

Inkapsulacija je metoda inkorporacije aktivnih sastojaka (čvrstih, tekućih i plinovitih) u „male“ čestice (Desai i Jin Park, 2005; Sobel i sur., 2014). Morfološki se razlikuju dva temeljna dijela čestice: aktivni sastojak koji se inkapsulira i materijal koji ga obavija (omotač, nosač) (Teixeira da Silva i sur., 2014; Jabeen i sur., 2017). Omotač mora biti kohezivan te kemijski inertan u cilju održavanja stabilnosti, fleksibilnosti i čvrstoće čestice (Jabeen i sur., 2017). Prema obliku, čestice se dijele na pravilne i nepravilne (Vasisht, 2014; Ribeiro i sur., 2019), a s obzirom na veličinu postoje makročestice ($> 5\ 000\ \mu\text{m}$), mikročestice ($0,2 - 5\ 000\ \mu\text{m}$) te nanočestice ($< 5\ 000\ \mu\text{m}$) (Teixeira da Silva i sur., 2014) (Slika 4.) Treća klasifikacija temelji se na strukturi te razlikujemo dva osnovna tipa, matrične čestice i kapsule. Matrične čestice su sustavi u kojima je aktivan sastojak jednoliko raspršen ili otopljen u matriksu. Kapsule se sastoje od unutarnje jezgre koja sadrži aktivan sastojak i obložena je jednim ili više polimernih omotača, odnosno, razlikujemo jedno- i višejezgrene kapsule i agregate čestica (Vasisht, 2014; Jabeen i sur., 2017; Jurić i sur., 2019; Ribeiro i sur., 2019). Pretežno se pripremaju čestice sferičnog oblika i mikronskih dimenzija te ih nazivamo mikrosfere ili mikrokapsule, a uz inkapsuliran aktivan sastojak razlikujemo formulacije mikrosfera ili formulacije mikrokapsula.



Slika 4. Shematski prikaz podjele čestica s obzirom na veličinu, oblik i strukturu (Teixeira da Silva i sur., 2014; Vasisht, 2014; Jurić i sur., 2019; Ribeiro i sur., 2019).

Odabir materijala omotača prvenstveno ovisi o primjeni čestica, a najčešće korišteni materijali u prehrambenoj industriji su polisaharidi (alginat, arabik guma, celuloza, ciklodekstrin, dekstran, guar guma, hemiceluloza, karagenan, ksantan guma, pektin i škrob), proteini (albumin, elastin, gluten, kazein, kazeinat, kolagen, proteini sirutke, soja, zein i želatina) te voskovi (karnauba, mikrokristalni, parafinski i pčelinji) (Doppalapudi i sur., 2014.; Namdeo, 2014.; Sobel i sur., 2014.; Teixeira da Silva i sur., 2014.; Rastogi i Samyn, 2015.; Gadeyne i sur., 2017.; Leyva-Gómez i sur., 2018).

Osim o omotaču, efikasnost inkapsulacije, njezina primjena i stabilnost ovise i o metodi izrade. Metode se dijele na: kemijske (granična i *in situ* polimerizacija), fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sterilizacija ekstruzijom, korištenje superkritičnih tekućina) i fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, koacervacija, ekstrakcija otapala isparavanjem) (Sobel i sur., 2014; Teixeira da Silva i sur., 2014; Jabeen i sur., 2017). Izbor materijala omotača i metoda inkapsulacije zavisne su varijable, no ne postoji metoda koja je adaptabilna za sve vrste omotača te je uobičajena praksa kombinirati 2 ili više materijala omotača.

U agronomiji, posebna važnost pridodaje se inkapsulaciji pesticida, insekticida i fungicida s ciljem njihovog ciljanog i kontroliranog otpuštanja, a samim time smanjenju upotrebe visoko koncentriranih i toksičnih materijala (Vinceković i sur., 2019). Značajan napredak ostvaren je i u prehrambenoj industriji. Primarna namjena inkapsulacije bioaktivnog sastojka u mikročestice je zaštita od vanjskih utjecaja te ciljano i kontrolirano otpuštanje aktivnog sastojka djelovanjem specifičnog stimulansa (otapalo, temperatura, tlak, promjena pH vrijednosti) (Desai i Jin Park, 2005; Sobel i sur., 2014; Vinceković i sur., 2019). Ostvaruje se i zaštita od degradacije, oksidacije i evaporacije tijekom skladištenja, produžetak roka trajnosti proizvoda, redukcija hlapljivosti sastojka te maskiranje nepoželjnih okusa i mirisa (Desai i Jin Park, 2005; Sobel i sur., 2014; Jurić i sur., 2020a). S obzirom na sve veću osviještenost o korelaciji kvalitete namirnica i zdravlja, povećava se proizvodnja i ekstrakcija sekundarnih biljnih metabolita te njihova inkapsulacija (Massounga Bora i sur., 2018; Vinceković i sur., 2019; Lee i Chang, 2020).

1.5. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja i svojstva biopolimera (natrijev alginat, kazein i ksantan guma)

Metoda ionskog geliranja temelji se na interakciji ionskog polimera sa suprotno nabijenim ionom što rezultira poprečnim povezivanjem polimernih lanaca i stvaranjem trodimenzionalne mreže gela (Usmiati i sur., 2014). Polimerna otopina, koja je nosač željenog ekstrakta, iglom ili mlaznicom se ispušta u vodenu otopinu polivalentnih kationa (uz konstantno miješanje). Difuzijom polivalentnih kationa u otopinu inicira se geliranje i nastaje mrežasta struktura gela (Patil i sur., 2010). Novonastale čestice se, po završenom postupku, filtriraju i ispiru destiliranom vodom te suše (Racovitá i sur., 2009).

U prehrambenoj industriji velika se pozornost pridodaje ekološko prihvatljivoj i održivoj proizvodnji, a upotreba biopolimera sve je veća. Biopolimeri su biokompatibilni, biorazgradivi, obilno zastupljeni u prirodi, netoksični i relativno jeftini (Shankar i Rhim, 2018; Vinceković i sur., 2019). Prefiks „bio“ ukazuje na njihovo porijeklo nastanka od živih organizama (Estevinho i Rocha, 2018; Shankar i Rhim, 2018), a njihovom razgradnjom nastaju ugljikov dioksid i voda. Svaki biopolimer ima svoje prednosti i nedostatke, a njihovom kombinacijom se postiže stabilnost, kvaliteta i funkcija željenog proizvoda.

U ovom radu korišten je natrijev alginat kao osnovni polimer, samostalno ili u smjesi s kazeinom kravljeg mlijeka ili ksantan gumom te u kombinaciji s kazeinom kravljeg mlijeka i ksantan gumom u cilju istraživanja sinergističkog utjecaja kombinacije nosača na otpuštanje aktivnih sastojaka iz mikročestica pripremljenih metodom ionskog geliranja.

Natrijev alginat ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) je linearni polisaharid, derivat alginske kiseline koji sadrži 30-60% alginske kiseline (Loureiro dos Santos, 2017). Stvaraju ga smeđe morske alge *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* i *Macrocystis pyrifera* te dva roda bakterija *Azotobacter* i *Pseudomonas* (Goh i sur., 2012). Građen je od β -D-manuronske kiseline koja tvori M jedinice i α -L-guluronske kiseline koja tvori G-jedinice. M i G jedinice su povezane 1 \rightarrow 4 glikozidnom vezom i tvore GG, MG i MM blokove (Ching i sur., 2015; Maiti i Kumari, 2016). Molekulaska težina i fizikalna svojstva alginata ovise upravo o udjelu i sekvenci M i G jedinica, a njegov afinitet prema kationima direktno je proporcionalan udjelu G jedinica (Goh i sur., 2012; Ching i sur., 2015). Temeljna odlika alginata je sposobnost geliranja u prisustvu dvovalentnih i polivalentnih kationa,

a najčešće se koristi kalcijev ion. Zbog velikog broja –OH i –COOH skupina, alginat je negativno nabijen i reaktivan, a rezultat vezanja kationa na neku od navedenih skupina je prijelaz iz viskozne tekućine u gel fazu čime sadržaj, koji se inkapsulira, ostaje zarobljen unutar čestice (Ching i sur., 2015; Maiti i Kumari, 2016; Loureiro dos Santos, 2017). S obzirom na svoja fizikalna i kemijska svojstva, natrijev alginat se upotrebljava u prehrambenoj industriji, farmaciji, tkivnom inženjerstvu (regeneracija kože, hrskavice, kostiju, mišića i živaca) i kozmetičkoj industriji (Loureiro dos Santos, 2017).

Ksantan guma je prirodan, biorazgradljiv polisaharid dobiven aerobnom fermentacijom bakterija *Xanthomonas campestris* koje se nalaze na lišću biljaka porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) (Sworn, 2009; Cano-Barrita i León-Martínez, 2016). Primarna struktura ksantan gume ista je kao i kod celuloze; lanac β-D-glukoza povezanih 1→4 glikozidnom vezom. Na svaku drugu molekulu glukoze vezan je trisaharid koji sadrži ostatke glukuronske kiseline vezane 1→4 glikozidnom vezom za terminalnu manozu i 1→2 glikozidnom vezom za drugu manozu povezanu s temeljnim lancem (Sworn, 2009). Reološko je kontrolno sredstvo u različitim vodenim sustavima i stabilizator za emulzije, suspenzije i pjene te se nerijetko koristi u sladoledima, nadjevima za salate te različitim umacima i sirupima (Kulkarni i Shaw, 2016). Zbog izvrsne stabilnosti pri različitim pH vrijednostima i temperaturama, topljivosti u vodi, uniformne viskoznosti (pri različitim temperaturama) i rezistentnosti na enzimatsku aktivnost (proteaza, celulaza, amilaza) dodatak je pekarskim, slastičarskim i mliječnim proizvodima (Sworn, 2009; Kulkarni i Shaw, 2016).

Kazein (lat. *caseus*-sir) je kolektivno ime za skupinu proteina u mlijeku i glavna je komponenta sira (Głąb i Boratyński, 2017). Specifična struktura micela kazeina proizlazi iz njegovih građevnih subjedinica, odnosno genetskih frakcija: αs1, αs2, β i κ-kazein. Frakcije αs1, αs2, β-kazein vežu na sebe kalcij i fosfor i izgrađuju unutrašnji, hidrofobni dio micela. Vanjski, hidrofilni dio micela čini κ-kazein koji stabilizira cjelokupnu strukturu (Newmark Milligan, 2018). Izlaganjem micela niskom pH (u želucu), digestivni enzim kimoziin „odreže“ κ-kazein, a time hidrofobne jedinice, izložene vanjskim utjecajima, formiraju gruše koji postepeno otpušta nutrijente. Osim različite pozicije, genetske frakcije kazeina razlikuju se u primarnoj strukturi i nemaju jasno definiranu sekundarnu i tercijarnu strukturu (Bhat i sur., 2016). Spomenuta saznanja o strukturi kazeina dovode u pitanje prijašnje postavke prema kojima samo proteini s egzaktnom sekundarnom i

tercijarnom strukturom mogu vršiti specifične funkcije u organizmu. Relativno niska cijena, jednostavna upotreba, dostupnost, biorazgradljivost, fizikalna i kemijska svojstva kazeina razlozi su sve većeg interesa znanstvenika i njegove primjene u mikroinkapsulaciji (Głąb i Boratyński, 2017).

2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

2.1. Hipoteza

Hipoteza ovoga istraživanja je da se boljim razumijevanjem molekulskih međudjelovanja u formulacijama biopolimernih mikročestica s biološki aktivnim sastojcima potakne razvoj i proizvodnja novih, ekološko prihvatljivih i zdravstveno ispravnih prehrambenih proizvoda.

2.2. Opći i specifični ciljevi rada

Na temelju hipoteze, postavljeni su sljedeći **opći ciljevi istraživanja**:

1. Pripraviti nove formulacije mikročestica upotrebom natrijevog alginata (ALG), kazeina kravljeg mlijeka (KAZ) i ksantan gume (XGUM) (kao nosača) s inkapsuliranim biološki aktivnim sastojcima (polifenoli (TPC) ekstrahirani iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom).
2. Provesti fizikalno - kemijsku karakterizaciju formulacija mikročestica.
3. Istražiti kinetiku i mehanizme otpuštanja bioaktivnih sastojaka iz formulacija mikročestica u cilju jednostavne, sigurne i učinkovite primjene u agro-prehrambenoj industriji.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Optimizirati proces ultrazvučne ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni upotrebom vode kao ekstrakcijskog otapala.
2. Postupkom ionskog geliranja pripraviti mikrosfere: a) alginata (ALG), b) smjese alginata i kazeina kravljeg mlijeka (ALG-KAZ), c) smjese alginata i ksantan gume (ALG-XGUM) te d) smjese alginata, kazeina kravljeg mlijeka i ksantan gume (ALG-KAZ-XGUM) različitih veličina (750 i 1000 μm) ispunjene biološki aktivnim sastojcima (polifenoli ekstrahirani iz

praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni optimiziranom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom).

3. Odrediti učinkovitost i kapacitet inkapsulacije ekstrahiranih, ukupnih polifenola iz lišća stevije u mikrosfere.
4. Odrediti suhu tvar u mikrosferama te stupanj bubrenja mikročestica.
5. Istražiti morfološke karakteristike pripremljenih mikrosfera, odnosno mikročestica.
6. Istražiti kinetiku i mehanizme otpuštanja ukupnih polifenola ekstrakta stevije iz formulacija mikročestica u uobičajenim prehrambenim otapalima (voda i otopine NaCl) i simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

Komercijalno dostupni suhi listovi biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni usitnjeni su upotrebom homogenizatora FOSS 2094 (Hillerød, Danska) do čestica veličine manje od 450 µm. Prah stevije pohranjen je u hermetički zatvorene polipropilenske vrećice, zaštićen od svjetla te skladišten na sobnoj temperaturi do provođenja analiza.

3.1.2. Kemikalije

U istraživanju su korišteni natrijev alginat niske viskoznosti (CAS broj: 9005 – 38 – 3), kazein kravljeg mlijeka (CAS broj: 9000 – 71 – 9), ksantan guma (CAS broj: 11138 – 66 – 2) i galna kiselina nabavljeni od tvrtke Sigma Aldrich (SAD). Bezvodni kalcijev klorid (CaCl_2), klorovodična kiselina (HCl), natrijev klorid (NaCl), natrijev citrat dihidrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$), natrijev hidroksid (NaOH), natrijev karbonat (Na_2CO_3), natrijev hidrogen karbonat (NaHCO_3), natrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) i natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) nabavljeni su od tvrtke Gram – mol (Hrvatska), a Folin-Ciocalteu od tvrtke VWR Chemicals BDH (Francuska). Sve kemikalije bile su analitičke čistoće te su korištene bez daljnjeg pročišćavanja.

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

3.2.1.1. Optimiziranje uvjeta ekstrakcije

Kod optimiziranja uvjeta ultrazvučne ekstrakcije, određen je raspon masene koncentracije iznosa 3 – 7 g/L praha stevije. Određena masa izvagana je na analitičkoj vagi (Precisa 100A-300M, Švicarska) te prelivena deioniziranom vodom na sobnoj temperaturi. Pripravljene uzorci su odmah podvrgnuti ultrazvučnom tretmanu na uređaju Ultrasonics Processor UP200St – Sonotrode S26d14 (Heilscher Ultrasonics GmbH, Njemačka) pri različitim amplitudama (50 % ili 75 %) i vremenu (10 min i 17 min) (Tablica 2.).

Tablica 2. Optimiziranje uvjeta ekstrakcije ukupnog sadržaja polifenola iz praha stevije.

amplituda (%)	koncentracija (g/L)	vrijeme (min)
50	5	17
50	3	17
75	7	10
75	6	10
75	5	10
75	3	10

Po završetku provedenog ultrazvučnog tretmana, uzorci su odmah profiltrirani kroz jednoslojni muslin (u cilju uklanjanja većih čestica), a zatim je provedena filtracija pomoću Büchnerovog lijevka, Whiteman No.4 filter papira i vakuum pumpe. Dobiveni ekstrakti prebačeni su u odmjerne tikvice te nadopunjeni ekstrakcijskim otapalom (deioniziranom vodom) do oznake. Čuvani su u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C do spektrofotometrijskog određivanja ukupnog sadržaja polifenola.

3.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola

Ukupan sadržaj polifenola (TPC) određen je na temelju kolorimetrijske reakcije Folin-Ciocalteu reagensa s polifenolnim spojevima u otopini ekstrakta stevije po metodi (Yan i sur., 2020) (Slika 5.). U epruvetu je dodano 0,1 mL uzorka ekstrakta stevije, 7,9 mL deionizirane vode te 0,5 mL

Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen deioniziranom vodom u omjeru 1:2). Nakon 5 minuta, u reakcijsku smjesu dodano je 1,5 mL 20 %-tne (w/v) otopine Na₂CO₃. 20 %-tna otopina Na₂CO₃ pripravljena je otapanjem 200 g Na₂CO₃ u 800 mL deionizirane vode i zagrijavanjem do vrenja. Nakon hlađenja, u otopinu je dodano nekoliko kristalića Na₂CO₃ te je nakon 24 sata filtrirana i razrijeđena deioniziranom vodom do 1000 mL. Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na₂CO₃ u reakcijsku smjesu, sadržaj epruvete promiješan je na vorteksu 20 sekundi te je započela reakcija koja se odvija 2 sata na sobnoj temperaturi. Folin-Ciocalteu, smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, reagira s fenoksid ionom što rezultira njegovom oksidacijom te se Folin-Ciocalteu reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida (Jurić i Nutrizio, 2014). Udio polifenolnih spojeva u uzorku proporcionalan je intenzitetu plavog obojenja (Singleton i Rossi, 1965). Nakon 2 sata, spektrofotometrijski je određen intenzitet plavog obojenja mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 765 nm korištenjem UV-VIS spektrofotometra (Shimadzu UV-1700, Japan) i softvera UVProbe 2.10. Izmjerena apsorbancija umanjena je za iznos apsorbancije slijepe probe koja je pripravljena na jednak način kao i ispitivani uzorci, samo što je umjesto uzorka ekstrakta stevije sadržavala jednak volumen deionizirane vode.

Izrada baždarnog pravca za određivanje ukupnog sadržaja polifenola

Iz osnovne otopine standarda galne kiseline koncentracije 1000 mg/L, u odmjerne tikvice od 50 mL pripravljena su sljedeća razrjeđenja: 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 mg/L. Ponavlja se prethodno opisani postupak s Folin-Ciocalteu reagensom samo što je u reakcijsku smjesu, umjesto uzorka, dodano 0,1 mL pripremljenih razrjeđenja galne kiseline.

Na temelju poznatih vrijednosti koncentracija galne kiseline i izmjerenih vrijednosti apsorbancije uzorka ekstrakta stevije, konstruiran je baždarni pravac koji prikazuje ovisnost apsorbancije (y-os, ΔA) o koncentraciji (x-os, mg/L), a njegova jednadžba glasi:

$$y = 0,0009x + 0,0072$$

gdje je x poznata koncentracija galne kiseline (u mg/L), a y izmjerene vrijednosti apsorbancije uzorka na valnoj duljini od 765 nm umanjene za iznos apsorbancije slijepe probe (ΔA). Prema navedenoj jednadžbi baždarnog pravca, izračunata je koncentracija ukupnog sadržaja polifenola u uzorku (za izmjerene vrijednosti apsorbancije), a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta

galne kiseline po litri ekstrakta stevije (mg EKG/L). Mjerenja su ponovljena tri puta te su rezultati prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.



Slika 5. Postupak određivanja ukupnog sadržaja polifenola iz ekstrakta praha lišća stevije.

(Izvor: Sara Kolar)

3.2.1.3. Priprava otopina ekstrakta za inkapsulaciju

Nakon provedene optimizacije ultrazvukom potpomognute ekstrakcije stevije, pri optimalnim uvjetima, pripremljeni su ekstrakti za proces inkapsulacije. 0,6 g uzorka praha stevije odvaži se (analitička vaga (Precisa 100A-300M, Švicarska) u staklenu čašu uz dodatak 100 mL deionizirane vode kao ekstrakcijskog otapala. Pripremljeni uzorak podvrgnut je ultrazvučnom tretmanu na uređaju Ultrasonics Processor UP200St – Sonotrode S26d14 (Heilscher Ultrasonics GmbH, Njemačka) pri amplitudi 75 % i vremenu od 9 minuta (Slika 6.). Slijedi filtracija kroz jednoslojni muslin u cilju uklanjanja većih čestica te filtracija pomoću Büchnerovog lijevka, Whiteman No.4 filter papira i vakuum pumpe. Dobiveni ekstrakt prebačen je u odmjernu tikvicu te nadopunjen

ekstrakcijskim otapalom (deioniziranom vodom) do oznake te čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C za daljnje kemijske analize.



Slika 6. Postupak ultrazvučne ekstrakcije.

(Izvor: Sara Kolar)

3.2.2. Priprava mikrosfera

Postupkom ionskog geliranja, pri sobnoj temperaturi, pripravljene su mikrosfera različitog sastava i veličina (750 i 1000 μm) s inkapsuliranim ekstraktom stevije. Inkapsulacija je provedena na inkapsulatoru Büchi-Encapsulator B-390 (BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska).

Priprava mikrosfera započinje pripravljanjem otopina ekstrakta stevije pri optimalnim uvjetima (opisano u cjelini 3.2.1.3. Priprava otopina ekstrakta za inkapsulaciju). U dio pripravljenog ekstrakta stevije (400 mL) dodan je natrijev alginat kao osnovni polimer, samostalno ili u smjesi s kazeinom kravljeg mlijeka ili ksantan gumom te u kombinaciji s kazeinom kravljeg mlijeka i ksantan gumom. Otopina se miješa na magnetskoj miješalici (BIOSAN MSH-300, Latvija) do otapanja svih sastojaka. Zatim se otopina (nosač) propušta kroz mlaznicu određene veličine pri određenoj frekvenciji, tlaku i amplitudi u otopinu ekstrakta stevije i kalcijevog klorida (400 mL) uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici (IKA topolino, SAD) čime gotovo trenutno nastaju mikrosfere (Slika 7.). Koncentracija kalcijeva klorida bila je konstantna kod pripreve svih vrsta mikrosfera (2 % w/v) dok su u tablici 3. prikazani sastavi otopina nosača (w/v) te uvjeti inkapsulacije za izradu pojedinih vrsta mikrosfera. Pripravi otopina nosača, koje osim natrijevog alginata, sadrže kazein kravljeg mlijeka prethodi otapanje 1 g kazeina u 10 mL destilirane vode i 1 mL 1 mol dm^{-3} NaOH. Zatim se otopina zagrijava 30 minuta na 50 °C i dodaje u otopinu nosača.

Kod izrade svih vrsta mikrosfera, nakon inkapsulacije, mikrosfere se dodatno miješaju na magnetskoj miješalici (BIOSAN MSH-300, Latvija) u nativnoj otopini 45 minuta kako bi dodatno očvrsnule. Slijedi filtracija mikrosfera kroz jednoslojni muslin i ispiranje deioniziranom vodom u cilju ispiranja suvišnog CaCl_2 . Nakon ispiranja, mikrosfere se razmažu u što tanjem sloju na masni papir (Slika 8a) i suše na sobnoj temperaturi 4 dana bez njihova izlaganja svjetlosti (Slika 8b). Sušenjem mikrosfere gube sferičan oblik te se nazivaju mikročestice.

Tablica 3. Prikaz sastava otopina nosača (w/v) i uvjeta inkapsulacije za izradu svih vrsta mikrosfera.

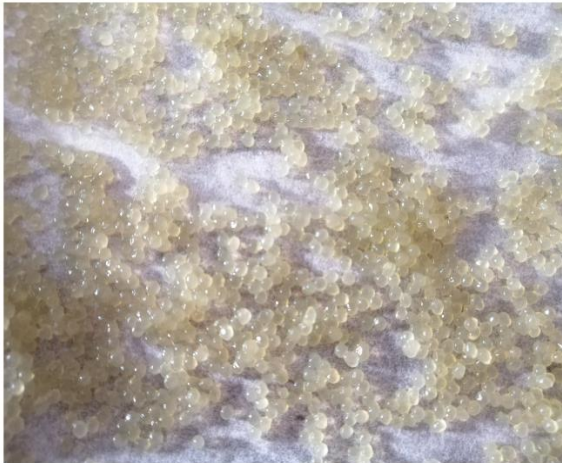
Sastav otopine nosača (w/v)	Uvjeti inkapsulacije			
	Veličina mikrosfera (µm)	Frekvencija (Hz)	Amplituda	Tlak (mBar)
ALG (1,5 %)	750	60	4	21
ALG (1,2 %) + XGUM (0,3 %)	750	40	3	40
ALG (1,3 %) + KAZ (0,2 %)	750	40	3	11
ALG (1 %) + XGUM (0,3 %) + KAZ (0,2 %)	750	40	3	55
ALG (1,5 %)	1000	40	3	25
ALG (1,2 %) + XGUM (0,3 %)	1000	40	6	35
ALG (1,3%) + KAZ (0,2 %)	1000	40	6	25
ALG (1 %) + XGUM (0,3 %) + KAZ (0,2 %)	1000	40	6	60



Slika 7. Postupak pripreve mikrosfera metodom ionskog geliranja.

(Izvor: Sara Kolar)

Sve mikročestice pohranjene su u plastične Falcon epruvete, zaštićene od svjetla te skladištene na sobnoj temperaturi do provođenja kemijskih analiza. Nakon pripreve mikrosfera metodom ionskog geliranja i sušenja, testirana su njihova fizikalno-kemijska svojstva.



(a)



(b)

Slika 8. (a) Slike vlažnih i (b) suhih mikrosfera (mikročestica).

(Izvor: Sara Kolar)

3.2.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera

3.2.3.1. Efikasnost inkapsulacije

Efikasnost inkapsulacije (EE) omogućuje određivanje neinkapsuliranog TPC-a, a određuje se uzimanjem uzorka iz native otopine u kojoj se dodatno miješaju novonastale mikrosfere nakon provedenog postupka ionskog geliranja (opisano u cjelini 3.2.2. Priprava mikrosfera). Iz uzorka, spektrofotometrijski se izmjeri TPC (opisano u cjelini 3.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola (TPC)). Efikasnost inkapsulacije izračunata je pomoću formule:

$$EE (\%) = \frac{L}{L_0}$$

gdje je L iznos spektrofotometrijski izmjereno TPC iz native otopine, a L_0 iznos TPC inicijalno optimiziranog ekstrakta stevije (Vinceković i sur., 2016; 2017). Mjerenja su ponovljena 5 puta, a rezultati su izraženi u % te prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.3.2. Kapacitet inkapsulacije

Kapacitet inkapsulacije (LC) je mjera koja pokazuje količinu aktivne tvari uspješno inkapsulirano u mikrosfere (Orešković, 2020), odnosno koliko je TPC-a prisutno u mikročesticama. Određuje se vaganjem 0,1 g formulacija mikročestica u staklenu čašu i dodavanjem 10 ml pufera (smjesa 16,80 g NaHCO₃ (0,2 mol/dm³) i 17,65 g Na₃C₆H₅O₇ × 2H₂O (0,06 mol/dm³, pH = 8,28) (Vinceković i sur., 2017). Smjesa se miješa na magnetskoj miješalici (BIOSAN MSH-300, Latvija) do otapanja formulacije mikročestica. Slijedi spektrofotometrijsko određivanje TPC iz uzorka na uređaju (Shimadzu UV-1700, Japan) opisano u cjelini 3.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola. Navedeni postupak proveden je za svaku vrstu mikročestica, a kapacitet inkapsulacije izračunat je pomoću jednadžbe:

$$LC = \frac{c \times V}{Wc}$$

gdje je *c* koncentracija TPC u uzorku, *V* je volumen uzorka, a *Wc* masa suhih mikročestica (Vinceković i sur., 2016; 2017) Mjerenja su ponovljena 5 puta, a rezultati su izraženi u mg/g suhih mikročestica te prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.3.3. Suha tvar

Suha tvar (ST) u mikrosferama (sadržaj ekstrakta stevije i nosača (biopolimera)) određena je u vlagomjeru (ADAM PMB 202, Ujedinjeno Kraljevstvo). Po 5 g mokrih (netom pripremljenih) mikrosfera stavljeno je u vlagomjer. Zagrijavanjem vlagomjera na 130 °C dolazi do dehidracije uzorka, tj. isparavanja tekućine i sušenja mikrosfera do konstantne mase. Dobiveni rezultat predstavlja udio suhe tvari u ukupnoj masi (izražen u %). Postupak je ponovljen 3 puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.3.4. Stupanj bubrenja mikročestica

3.2.3.4.1. Stupanj bubrenja mikročestica u deioniziranoj vodi

Stupanj bubrenja (*S_w*) mikročestica u deioniziranoj vodi određen je vaganjem 0,1 g formulacija mikročestica u epruvetu i dodatak 10 mL deionizirane vode. Mikročestice su zatim ostavljene da bubre pri sobnoj temperaturi tijekom 3 sata. Filtracijom kroz jednoslojni muslin uklonjen je suvišak vode, a zatim je masa nabubrenih mikročestica izmjerena vaganjem. Stupanj bubrenja (*S_w*) izračunat je pomoću jednadžbe:

$$S_w (\%) = \frac{W_t - W_o}{W_o}$$

gdje je W_t masa nabubrenih mikročestica, a W_o masa suhih mikročestica (Vinceković i sur., 2016; 2017). Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su izraženi u % te prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.3.4.2. Stupanj bubrenja mikročestica u otopinama natrijeva klorida

Stupanj bubrenja mikročestica u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl određen je vaganjem $0,1 \text{ g}$ suhih mikročestica u epruvetu i dodatak 10 mL $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl koja je pripravljena otapanjem $0,5845 \text{ g}$ NaCl u deioniziranoj vodi ($\text{pH} = 5,17$). Mikročestice su ostavljene da bubre pri sobnoj temperaturi 3 sata. Filtracijom kroz jednoslojni muslin uklonjen je suvišak otopine NaCl, a zatim je masa nabubrenih mikročestica izmjerena vaganjem. Stupanj bubrenja (S_w) izračunat je pomoću jednadžbe:

$$S_w (\%) = \frac{W_t - W_o}{W_o}$$

gdje je W_t masa nabubrenih mikročestica, a W_o masa suhih mikročestica (Vinceković i sur., 2016; 2017). Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su izraženi u % te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Postupak određivanja stupnja bubrenja mikročestica u $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ otopini NaCl (pripravljena otapanjem $2,9225 \text{ g}$ NaCl u 100 mL deionizirane vode, $\text{pH} = 5,14$) proveden je na jednak način te su mjerenja ponovljena 3 puta, a rezultati izraženi u % te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.3.4.3. Stupanj bubrenja mikročestica u otopini klorovodične kiseline

Stupanj bubrenja u otopini klorovodične kiseline (pripravljena dodavanjem $2,04 \text{ mL}$ HCl u 1 L deionizirane vode. Odvagan je $0,1 \text{ g}$ formulacija mikročestica u epruvetu uz dodatak 10 mL otopine HCl. pH vrijednost suspenzije je bila $1,58$ (Mettler Toledo MPC227, Belgija)) Mikročestice su ostavljene da bubre pri sobnoj temperaturi 3 sata. Filtracijom kroz jednoslojni muslin uklonjen je suvišak HCl, a zatim je masa nabubrenih mikročestica izmjerena vaganjem. Stupanj bubrenja (S_w) izračunat je pomoću jednadžbe:

$$S_w (\%) = \frac{W_t - W_o}{W_o}$$

gdje je W_t masa nabubrenih mikročestica, a W_o masa suhih mikročestica (Vinceković i sur., 2016; 2017). Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su izraženi u % te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.4. Mikroskopska promatranja

3.2.4.1. Morfologija i prosječan promjer suhih mikročestica

Morfološke karakteristike i prosječan promjer mikročestica prije i nakon nakon bubrenja u deioniziranoj vodi, HCl-u i otopinama NaCl-a mjereni su stereomikroskopom Leica MZI6a (Leica Microsystems Ltd., Švicarska) pomoću softvera Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (verzija E_LCmicro_09Okt2009).

Promatranje površine mikročestica te elementarna kemijska analiza površine mikročestica energetskim disperzivnim X – spektrom zračenja (EDS) provedeni su pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM, FE-SEM, model JSM-7000F, Jeol Ltd., Japan) uz korištenje softvera ImageJ.

Promjeri su mjereni na oko 100 mikročestica. Rezultati su izraženi u μm i prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi.

3.2.4.2. Prosječan promjer mikročestica nakon bubrenja u deioniziranoj vodi

Prosječan promjer mikročestica nakon bubrenja u deioniziranoj vodi određen je vaganjem 0,1 g suhih mikročestica u epruveti te dodatkom 10 mL deionizirane vode. Mikročestice su ostavljene da bubre na sobnoj temperaturi 3 sata. Zatim, na oko 100 mikročestica su izmjereni promjeri. Rezultati su izraženi u μm i prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.4.3. Prosječan promjer mikročestica nakon bubrenja u otopinama natrijeva klorida

Prosječan promjer mikročestica nakon bubrenja u otopinama NaCl određen je vaganjem 0,1 suhih mikročestica u epruvetu te dodatkom 10 mL 0,1 ili 0,5 mol dm^{-3} NaCl (pripravljene postupkom opisanim u cjelini 3.2.3.4.2. Stupanj bubrenja mikročestica u otopinama natrijeva klorida). Mikročestice su ostavljene da bubre na sobnoj temperaturi 3 sata i zatim, na oko 100 mikročestica su izmjereni promjeri. Rezultati su izraženi u μm i prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.4.4. Prosječan promjer mikročestica nakon bubrenja u otopini klorovodične kiseline

Prosječan promjer mikročestica nakon bubrenja u klorovodičnoj kiselini (HCl) određen je vaganjem 0,1 g suhих mikročestica te dodatkom 10 mL klorovodične kiseline (pH = 1,58). Mikročestice su ostavljene da bubre na sobnoj temperaturi 3 sata. Na oko 100 mikročestica izmjereni su promjeri. Rezultati su izraženi u μm i prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.5. In vitro otpuštanje TPC iz formulacija mikročestica

3.2.5.1. In vitro otpuštanje TPC iz formulacija mikročestica u deioniziranoj vodi

In vitro otpuštanja ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica ispitana su dispergiranjem suhих mikročestica u deioniziranoj vodi i miješanjem na sobnoj temperaturi. Izvagano je 1,33 g suhих mikročestica u čašu te je dodano 20 mL deionizirane vode. Disperzija se miješa na magnetskoj miješalici (BIOSAN MSH-300, Latvija) te su uzimani alikvoti u vremenskim intervalima: 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 1440, 5760 i 10 080 minuta. Otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica praćeno je u određenim vremenskim intervalima spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije kumulativno otpuštenog TPC (opisano u cjelini 3.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola). Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.5.2. In vitro otpuštanje TPC iz formulacija mikročestica u otopinama natrijeva klorida

In vitro otpuštanja ukupnog sadržaja polifenola iz formulacija mikročestica ispitana su dispergiranjem suhих mikročestica u otopinama NaCl (postupak pripreme otopine opisan u cjelini 3.2.3.4.2. Stupanj bubrenja mikročestica u otopinama natrijeva klorida) i miješanjem na sobnoj temperaturi. Izvagano je 1,33 g suhих mikročestica u čašu te je dodano 20 mL 0,1 ili 0,5 mol dm^{-3} otopine NaCl. Disperzija se miješa na magnetskoj miješalici (BIOSAN MSH-300, Latvija), a alikvoti su uzimani u vremenskim intervalima: 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 1440, 5760 i 10 080 minuta. Otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica praćeno je u određenim vremenskim intervalima spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije kumulativno otpuštenog TPC (opisano u cjelini 3.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola).

Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.5.3. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

3.2.5.3.1. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u otopini klorovodične kiseline

In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim gastro uvjetima ispitivano je dispergiranjem suhih mikročestica u otopini HCl (postupak pripreme opisan u cjelini 3.2.3.4.3. Stupanj bubrenja mikročestica u otopini klorovodične kiseline, pH = 1,58). Izvagano je 1,33 g suhih mikročestica u čašu te je dodano 20 mL otopine HCl. Čaša s disperzijom stavljena je u reaktor s vodom kao medijem (prikazan na slici 9.) koji održava konstantnu temperaturu od $37,0 \pm 0,1$ (simulacija biološke temperature). Disperzija se miješa na magnetskoj miješalici (Tehtnica Železniki MM-540, Slovenija), a alikvoti su uzimani u vremenskim intervalima: 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120 i 240 minuta. Otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica praćeno je spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije kumulativno otpuštenog TPC (opisano u cjelini 3.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola). Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

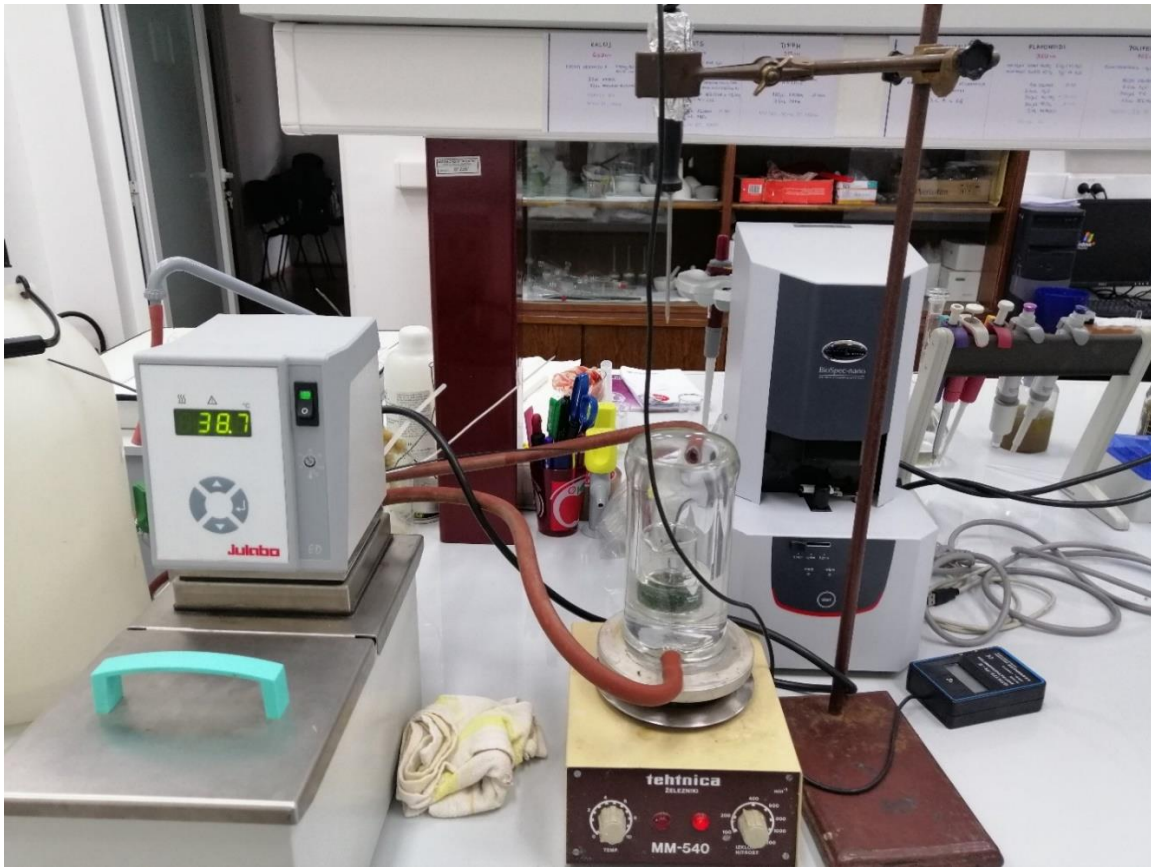
3.2.5.3.2. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u fosfatnom puferu

In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim intestinalnim uvjetima ispitivano je dispergiranjem suhih mikročestica u fosfatnom puferu (smjesa 0,2 M Na_2HPO_4 i 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, pH = $7,4 \pm 0,01$). Izvagano je 0,30 g suhih mikročestica u čašu te je dodano 30 mL fosfatnog pufera. Zatim je čaša s disperzijom stavljena u reaktor s vodom kao medijem (prikazan na slici 9.) koji održava konstantnu temperaturu od $37,0 \pm 0,1$ (simulacija biološke temperature). Disperzija se miješa na magnetskoj miješalici (Tehtnica Železniki MM-540, Slovenija), a alikvoti su uzimani u vremenskim intervalima: 1, 3, 5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 i 120 minuta. Otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica praćeno je spektrofotometrijskim određivanjem TPC (opisano u cjelini 3.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola).

Rezultati su grafički prikazani kao frakcija kumulativne količinom otpuštenog TPC (f) u ovisnosti o vremenu (t). Kumulativna količina otpuštenog TPC u određenom vremenu (TPC_t) od ukupne inkapsulirane količine u mikročesticama (TPC_{tot}) izračuna se prema jednadžbi:

$$f = \frac{TPCt}{TPCtot}$$

Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.



Slika 9. Reaktor za ispitivanje otpuštanja ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

(Izvor: Sara Kolar)

3.2.6. Statistička analiza

Statistička analiza rezultata provedena je pomoću programa XLSTAT (dodatak za Microsoft Office 2016). Provedena je ANOVA, a značajne razlike ($p < 0.05$) utvrđene su uz pomoć Tukey post-hoc testa s Bonferonijevom korekcijom. Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

4. REZULTATI

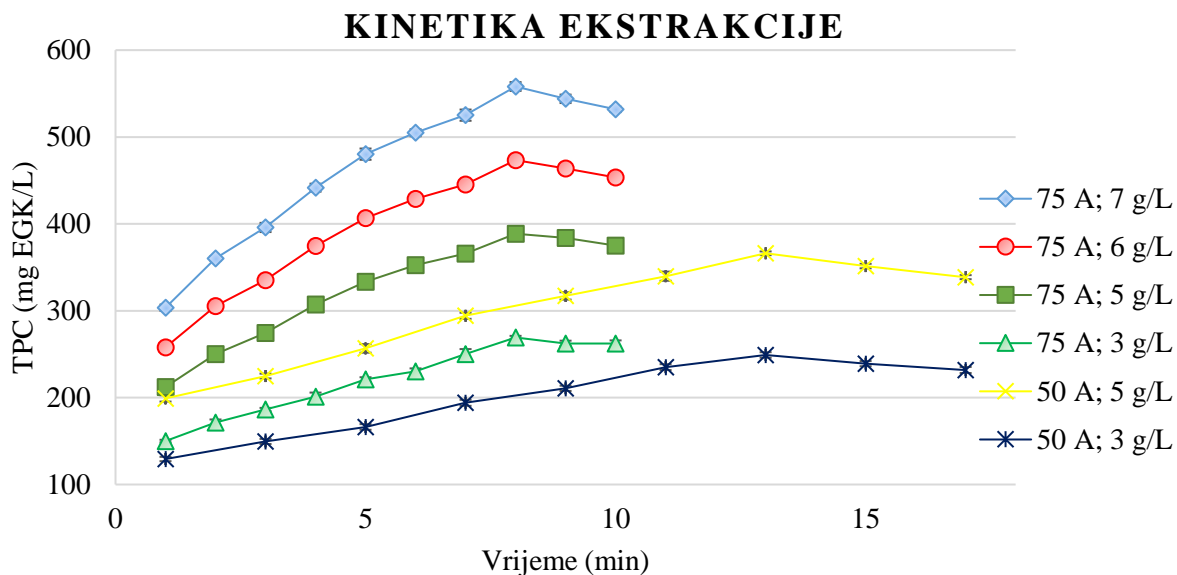
Dobiveni rezultati istraživanja prikazani su u dva dijela. U prvome dijelu prikazani su rezultati optimizacije ultrazvukom potpomognute ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni, a u drugome dijelu fizikalno – kemijska svojstva formulacija mikrosfera s optimiziranim ekstraktom stevije kao jezgrom te rezultati *in vitro* otpuštanja ukupnih polifenola iz mikrosfera u različitim otopinama.

4.1. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni

Kako bi se utvrdili optimalni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni, ekstrakcija je provedena prema eksperimentalnoj dizajnu prikazanom u tablici 2. Rezultati eksperimentalnog dizajna, tj. koncentracije ukupnih polifenola (TPC) dobivene pri zadanim ekstrakcijskim uvjetima (amplituda i koncentracija) i u određenim vremenskim intervalima, prikazani su na slici 10.

Inicijalno, već u 1. minuti ekstrakcije, zapažene su veće koncentracije ekstrahiranih ukupnih polifenola (TPC) primjenom viših koncentracija otopine stevije (5 g/L, 6 g/L i 7 g/L) i pri višoj amplitudi (75). Pozitivan trend zabilježen je do 9. minute nakon čega je uslijedio pad ekstrakcije ukupnih polifenola. Najveća koncentracija TPC-a (543,947 mg EKG/L) ostvarena je ekstrakcijom pri amplitudi 75, koncentraciji otopine stevije iznosa 7 g/L i u trajanju od 9 minuta. Iako se provedbom ekstrakcije pri amplitudi iznosa 75, koncentraciji od 6 g/L i u trajanju od 9 minuta postiže niži iznos TPC-a (467,926 mg EKG/L), utvrđivanjem vrijednosti iskorištenja materijala (omjer suhe tvari i ekstrahiranih polifenolnih spojeva) navedeni uvjeti pokazali su se optimalnima te su primijenjeni u pripremi otopina potrebnih za formuliranje mikrosfera metodom ionskog geliranja.

Najniže koncentracije TPC-a opažene su pri amplitudi 75, koncentraciji 3 g/L u 10. minuti ekstrakcije (262,185 mg EKG/L) te pri amplitudi 50, koncentraciji 3 g/L nakon 17 minuta ekstrakcije (231,815 mg EKG/L). Ultrazvučna ekstrakcija, pri navedenim koncentracijama i amplitudi, rezultirala je nižim ekstrakcijskim prinosima ukupnih polifenola tijekom cijelog ekstrakcijskog procesa.



Slika 10. Grafički prikaz koncentracije ukupnih polifenola (TPC) ekstrahiranih ultrazvučnom metodom u ovisnosti o vremenu primjenom zadanih ekstrakcijskih parametara. Na slici su označene pripadajuće standardne devijacije.

4.2. Fizikalno – kemijska karakterizacija mikrosfera

4.2.1. Efikasnost i kapacitet inkapsulacije i suha tvar

Efikasnost inkapsulacije (EE) i kapacitet inkapsulacije (LC) provedeni su s ciljem utvrđivanja ukupnog sadržaja polifenola u različitim formulacijama mikrosfera dviju veličina (750 i 1000 μm), a dobiveni rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Suha tvar (ST), efikasnost (EE) i kapacitet inkapsulacije (LC) u ovisnosti o formulaciji i veličini mikrosfera. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Veličina mikrosfera	Sastav mikrosfera	ST (%)	EE (%)	LC (mg/g)
1000 μm	ALG	3,1 \pm 0,1a	112,1 \pm 1,4a	6,0 \pm 0,3a
	ALG - XGUM	2,9 \pm 0,1a	106,7 \pm 1,5b	5,6 \pm 0,2ab
	ALG - KAZ	3,0 \pm 0,1a	118,4 \pm 3,3c	11,7 \pm 0,4c
	ALG - XGUM - KAZ	3,0 \pm 0,2a	117,7 \pm 1,9c	13,0 \pm 0,5d
750 μm	ALG	3,2 \pm 0,1a	112,7 \pm 0,7a	5,2 \pm 0,2be
	ALG - XGUM	3,0 \pm 0,1a	111,0 \pm 1,5a	5,0 \pm 0,2e
	ALG - KAZ	2,9 \pm 0,1a	121,9 \pm 3,0c	12,2 \pm 0,3cd
	ALG - XGUM - KAZ	3,0 \pm 0,1a	118,7 \pm 1,1c	13,3 \pm 0,5d

Vrijednosti označene istim slovom (u koloni) značajno se ne razlikuju ($p > 0.05$; Tukey post-hoc test s Bonferonijevom korekcijom)

Raspon EE, kod pripreve mikrosfera veličine 1000 μm , iznosio je 106 do 118 %, dok je kod pripreve mikrosfera veličine 750 μm raspon EE iznosio 111 do 121 %. Dodatkom biopolimera u formulacije (posljedično smanjenjem udjela natrijevog alginata) povećala se efikasnost inkapsulacije ukupnih polifenola u formulacijama mikrosfera ALG-KAZ i ALG-XGUM-KAZ (uz statistički beznačajnu razliku u sastavu i veličini mikrosfera). Najmanje vrijednosti EE izmjerene su kod formulacija mikrosfera ALG-XGUM, ali je opažena statistički značajna razlika između dviju veličina. Najveća efikasnost inkapsulacije izmjerena je kod formulacija ALG-KAZ te ALG-XGUM-KAZ.

Sličan trend zabilježen je i u rezultatima kapaciteta inkapsulacije. Dodatkom biopolimera u smjesu matriksa, uz posljedično smanjenje natrijevog alginata, LC se povećava bez obzira na veličinu, osim kod formulacije mikrosfera ALG-XGUM koja bilježi najmanji LC te ne pokazuje statistički značajnu razliku u usporedbi s formulacijom mikrosfera ALG. Najveći kapacitet inkapsulacije ostvaren je kod formulacije mikrosfera ALG-XGUM-KAZ uz statistički beznačajnu razliku za dvije veličine. Raspon suhe tvari mikrosfera, dobiven njihovom dehidracijom u vlagomjeru, iznosio je 2.8 - 3.2 % te statistički značajna razlika u sastavu i veličini mikrosfera nije detektirana.

4.2.2. Stupanj bubrenja

Nakon 3 sata bubrenja formulacija mikročestica različitih veličina u deioniziranoj vodi i otopini HCl, određeni su stupnjevi bubrenja te su rezultati prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Stupnjevi bubrenja (S_w) u ovisnosti o sastavu formulacija mikročestica i veličini mikrosfera u deioniziranoj vodi i otopini HCl. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Veličina mikrosfera	Sastav mikrosfera	S_w (%) u H ₂ O	S_w (%) u HCl (pH 1,58)
1000 μ m	ALG	52,8 \pm 0,9a	44,6 \pm 0,8a
	ALG - XGUM	111,8 \pm 2,8b	99,2 \pm 0,7b
	ALG - KAZ	50,6 \pm 1,1a	43,3 \pm 1,2ac
	ALG - XGUM - KAZ	218,8 \pm 7,2c	159,3 \pm 0,7d
750 μ m	ALG	51,4 \pm 0,2a	48,8 \pm 0,2c
	ALG - XGUM	114,7 \pm 2,4b	101,7 \pm 2,4b
	ALG - KAZ	63,8 \pm 1,9d	47,2 \pm 1,6ac
	ALG - XGUM - KAZ	156,1 \pm 4,1e	138,7 \pm 4,6d

Vrijednosti označene istim slovom (u koloni) značajno se ne razlikuju ($p > 0.05$; Tukey post-hoc test s Bonferonijevom korekcijom)

Znatno veće S_w vrijednosti u deioniziranoj vodi opaženi su u formulacijama mikročestica koje su sadržavale ksantan gumu (ALG-XGUM-KAZ te ALG-XGUM) za sve veličine mikročestica. Statistički značajna razlika u bubrenju između formulacija mikročestica ALG te ALG-KAZ nije utvrđena (izuzev za manje čestice). Stupanj bubrenja navedenih formulacija u deioniziranoj vodi je otprilike 50 % manji od stupnja bubrenja formulacije ALG-XGUM te 200 – 300 % (ovisno o veličini mikročestica) manji od formulacije ALG-XGUM-KAZ što ukazuje na veliki utjecaj ksantan gume u procesu bubrenja mikročestica.

Manji stupnjevi bubrenja svih formulacija mikročestica određeni su u otopini HCl. Najmanje vrijednosti S_w određeni su pri bubrenju formulacija mikročestica ALG i ALG-KAZ uz statistički beznačajan utjecaj veličina mikročestica. Već spomenuti trend povećanja bubrenja dodatkom ksantan gume u formulaciju (u deioniziranoj vodi) opažen je i bubrenjem u otopini HCl.

Vrijednosti stupnja bubrenja formulacija mikročestica veličine mikrosfera 1000 μm u otopinama NaCl prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Stupnjevi bubrenja (S_w) formulacija mikročestica veličine mikrosfera 1000 μm u otopinama NaCl. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Veličina mikrosfera	Sastav mikrosfera	S_w (%) 0,1 mol dm^{-3} NaCl	S_w (%) 0,5 mol dm^{-3} NaCl
1000 μm	ALG	56,9 \pm 1,0a	69,4 \pm 2,0e
	ALG - XGUM	189,5 \pm 8,2b	255,9 \pm 8,3f
	ALG - KAZ	52,9 \pm 2,5c	63,7 \pm 1,6e
	ALG - XGUM - KAZ	305,5 \pm 2,3d	379,9 \pm 9,7g

Vrijednosti označene istim slovom (u koloni) značajno se ne razlikuju ($p > 0.05$; Tukey post-hoc test s Bonferonijevom korekcijom)

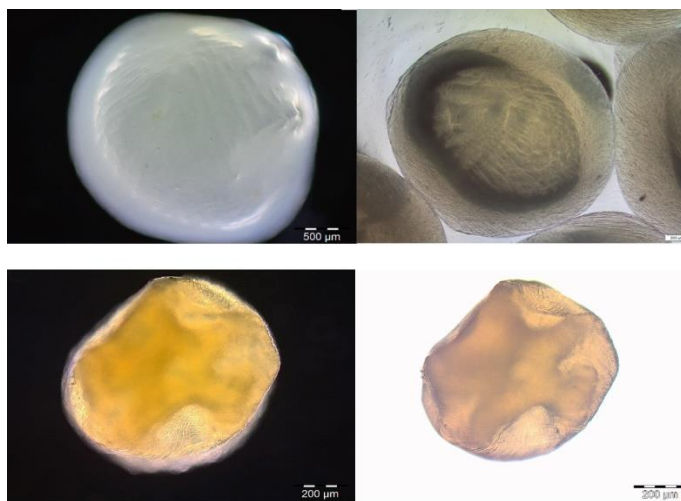
Usporedbom S_w različitih formulacije mikročestica (1000 μm) u deioniziranoj vodi te u otopinama NaCl, uočeno je kako su najveće vrijednosti izmjerene u 0,5 mol dm^{-3} otopini NaCl, a najmanje u deioniziranoj vodi (kod svih formulacija mikročestica). Opaženi trend povećanja stupnja bubrenja dodatkom ksantan gume u smjesu biopolimera (u deioniziranoj vodi i otopini HCl) (tablica 5.) detektiran je i kod izlaganja mikročestica u otopinama NaCl. Statistički značajna razlika između

formulacija mikročestica ALG te ALG-KAZ u $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ otopini nije zabilježena za razliku od bubrenja u $0,1 \text{ mol dm}$ otopini NaCl.

4.2.3. Morfologija i veličina mikrosfera

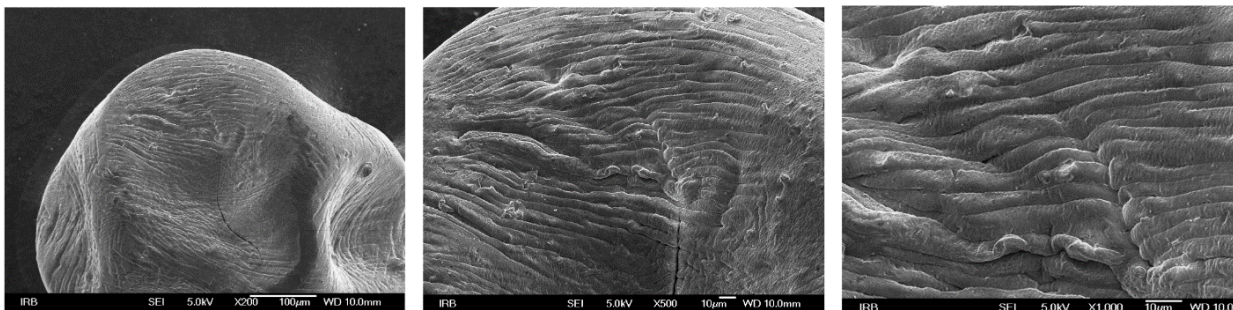
Mikrosfere pripravljene postupkom ionskog geliranja bile su sferičnog oblika (Slika 11a) uz prisutnost manjeg broja anomalija. Sušenje mikrosfera (četiri dana na zraku pri sobnoj temperaturi i bez izlaganja svjetlosti) rezultiralo je gubitkom sferičnog oblika i smanjenjem njihove veličine (Slika 11b).

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) korišten je za promatranje morfoloških i površinskih razlika između pripremljenih formulacija mikročestica. SEM fotografije prikazane su na slikama od 12 do 15. Rezultati elementarne analize prikazani su na slikama od 16 do 19.



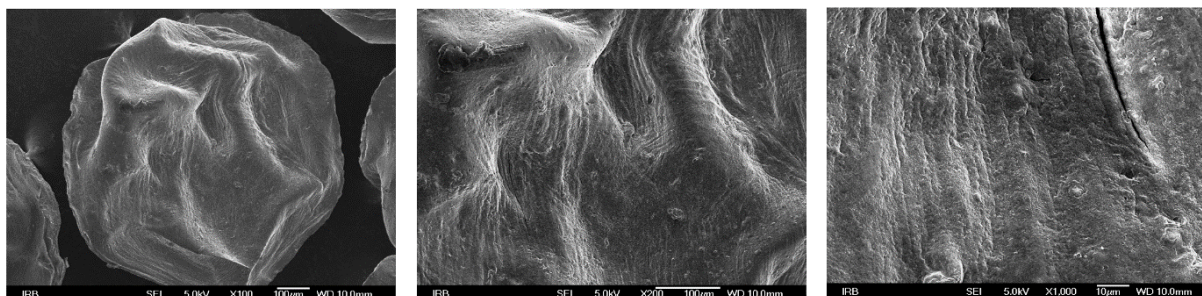
Slika 11. Mikroskopske fotografije mikrosfera (gore) i odgovarajućih mikročestica (dolje) s pripadajućim mjernim skalama.

(Izvor: Sara Kolar)



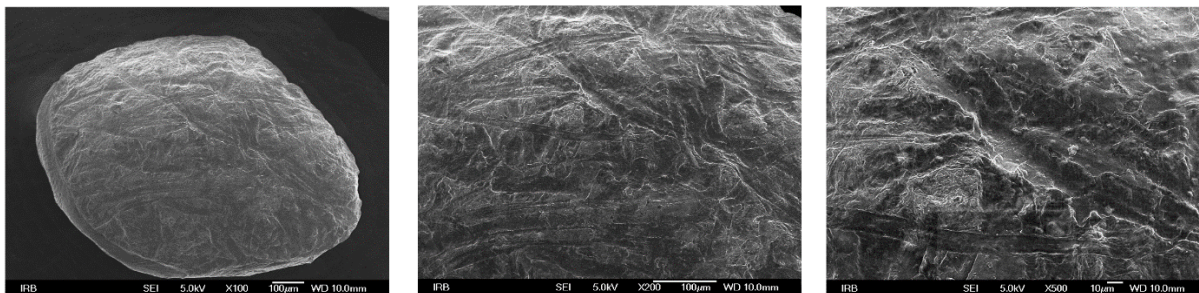
1000 µm natrijev alginat (1,5 %)

Slika 12. SEM fotografije formulacije mikročestica ALG (mikrosfere 1000 µm). Na fotografijama su prikazana i odgovarajuća mjerila.



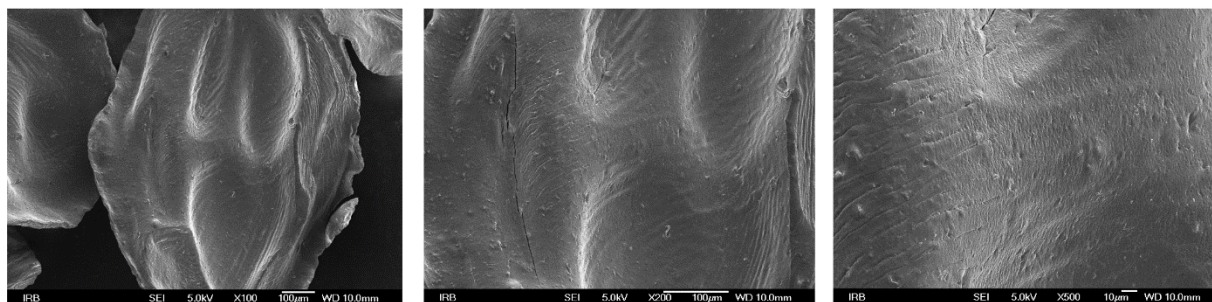
1000 µm natrijev alginat (1,2 %) i ksantan guma (0,3 %)

Slika 13. SEM fotografije formulacije mikročestica ALG-XGUM (mikrosfere 1000 µm). Na fotografijama su prikazana i odgovarajuća mjerila.



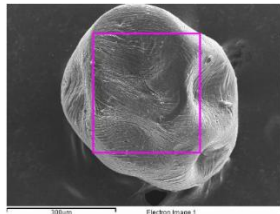
1000 µm natrijev alginat (1,3 %) i kazein kravljeg mlijeka (0,2 %)

Slika 14. SEM fotografije formulacije mikročestica ALG-KAZ (mikrosfere 1000 µm). Na fotografijama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

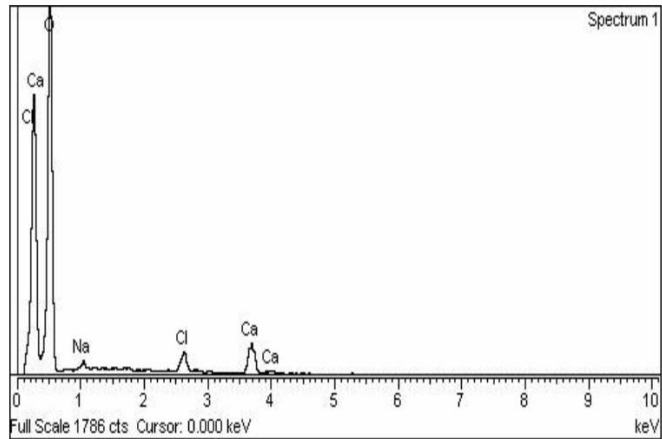


1000 µm natrijev alginat (1,0 %), ksantan guma (0,3 %), kazein kravljeg mlijeka (0,2 %)

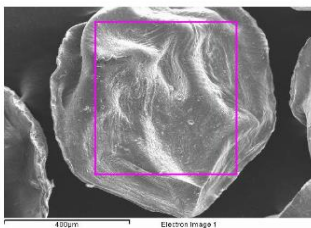
Slika 15. SEM fotografije formulacije mikročestica ALG-XGUM-KAZ (mikrosfere 1000 µm). Na fotografijama su prikazana i odgovarajuća mjerila.



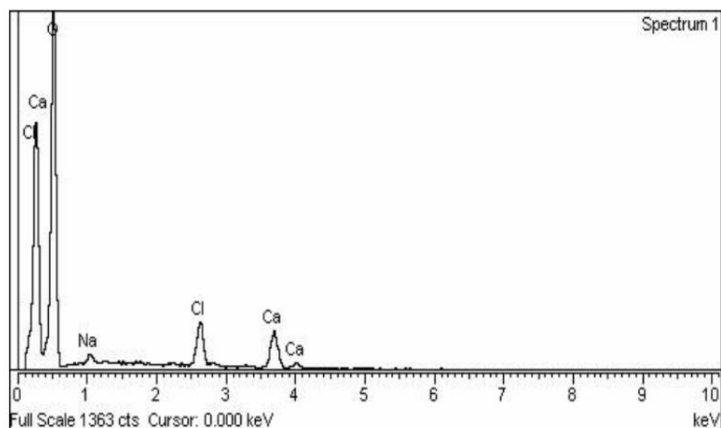
1000 μm natrijev alginat (1,5 %)



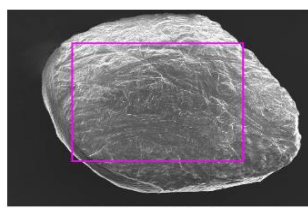
Slika 16. Morfologija i elementarna kemijska analiza površine (izražena u atomskim težinskim postotcima) formulacije mikročestica ALG energetskim disperzivnim X – spektrom zračenja (EDS). Sastav formulacija mikročestica i veličina mikrosfrea su naznačeni na slici.



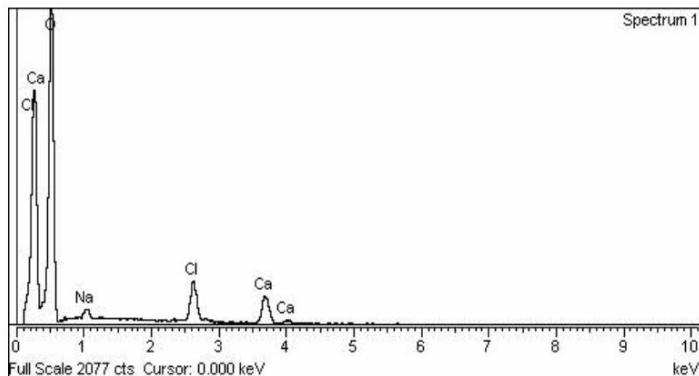
1000 μm natrijev alginat (1,2 %) i ksantan guma (0,3 %)



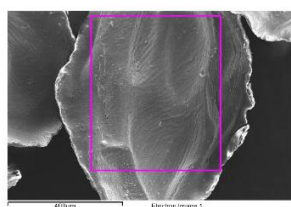
Slika 17. Morfologija i elementarna kemijska analiza površine (izražena u atomskim težinskim postotcima) formulacije mikročestica ALG-XGUM (1000 μm) energetskim disperzivnim X – spektrom zračenja (EDS). Sastav formulacija mikročestica i veličina mikrosfrea su naznačeni na slici.



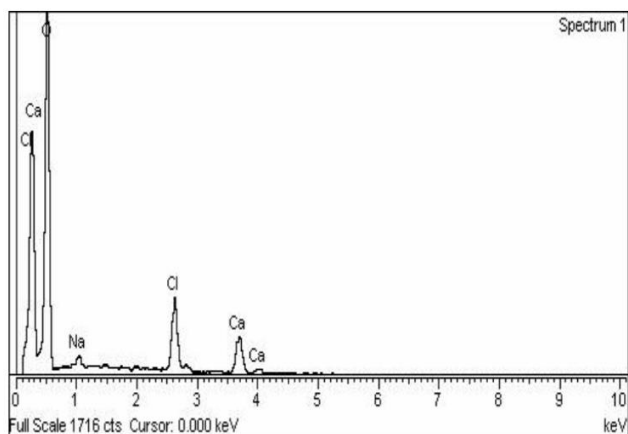
1000 µm natrijev alginat (1,3 %) i kazein kravljeg mlijeka (0,2 %)



Slika 18. Morfologija i elementarna kemijska analiza površine (izražena u atomskim težinskim postotcima) formulacije mikročestica ALG-KAZ energetskim disperzivnim X – spektrom zračenja (EDS). Sastav formulacija mikročestica i veličina mikrosfera su naznačeni na slici.



1000 µm natrijev alginat (1,0 %), ksantan guma (0,3 %), kazein kravljeg mlijeka (0,2 %)



Slika 19. Morfologija i elementarna kemijska analiza površine (izražena u atomskim težinskim postotcima) formulacija mikročestica ALG-XGUM-KAZ energetskim disperzivnim X – spektrom zračenja (EDS). Sastav formulacija mikročestica i veličina mikrosfrea su naznačeni na slici.

SEM analizom su opažene promjene u obliku i veličini mikročestica, uz pojavu nepravilnosti na njihovoj površini i porozna struktura s malo udubljenja (Slika 12. do Slika 15.). Mikrosfere ALG-XGUM (Slika 13.) su pravilnije s manje nabore u usporedbi s ALG mikrosferama (Slika 12.). Nakon sušenja, mikročestice ALG-KAZ su zadržale sferičan oblik uz glatku površinu bez velikih udubljenja (Slika 14.). Morfologija mikročestica ALG-XGUM-KAZ se najviše promijenila u odnosu na izvorne mikrosfere (Slika 15.). Uočava se da je kazein kravljeg mlijeka inkorporiran u smjesu biopolimernog gela bez pora i s izvrsnim integritetom strukture.

Elementarna kemijska analiza površine mikročestica (elektronska proba prodire do približno 1 μm) određena je energetske disperzivnim X-spektrom zračenja (EDS). Kod svih formulacija, detektirani su dominantni pikovi kisika (Slika 16. do Slika 19.). Male količine Na i Cl su vjerojatno ostaci spojeva korištenih tijekom pripreme formulacija mikročestica.

Rezultati mjerenja promjera formulacija mikročestica (dvije veličine) prije i nakon bubrenja u deioniziranoj vodi i otopini HCl prikazani su u Tablici 7. Rezultati su pokazali visoku varijabilnost uzrokovanu dodatkom polimera u formulaciju. Najmanji promjer izmjeren je kod formulacija mikročestica ALG, a dodatkom drugih biopolimera (uz smanjenje sadržaja alginata), uočen je trend povećanja promjera. Najveći promjer izmjeren je kod ALG-XGUM-KAZ formulacija mikročestica iznosa 1115 μm što je veće od promjera i od vlažnih mikrosfera (1000 μm). Trend povećanja veličina dodatkom drugih biopolimera u formulacije opažen je i kod manjih mikročestica, naročito kod mikročestica ALG-XGUM koje su nakon bubrenja bile veće i od izvornih mikrosfera.

Bubrenje formulacija mikročestica u deioniziranoj vodi rezultiralo je većim promjerima kod svih formulacija (u usporedbi s promjerima izmjerenima nakon sušenja). Najveći promjeri su izmjereni kod formulacija ALG-XGUM i ALG-XGUM-KAZ uz statistički beznačajnu međusobnu obzirom na veličinu. Statistički značajna razlika između promjera formulacija mikročestica ALG i ALG-KAZ nije detektirana. Isti trendovi opaženi su i kod manjih čestica, ali uz statistički značajne razlike u vrijednostima.

Bubrenjem u otopini HCl izmjerene su manja povećanja promjera mikročestica od bubrenih u deioniziranoj vodi. Spomenuti trend povećanja veličine mikročestica dodatkom ksantan gume u formulaciju (bubrenje u deioniziranoj vodi prikazano u tablici 5.), uočen je i kod bubrenja u otopini HCl.

Analizirane su i veličine mikročestica nakon bubrenja u 0,1 i 0,5 mol dm⁻³ otopini NaCl (veličine mikrosfera 1000 μm) te su rezultati prikazani u tablici 8. Usporedbom promjera različitih formulacija mikročestica nakon bubrenja u deioniziranoj vodi i otopinama NaCl opažene su značajne razlike. Najveći promjeri ostvareni su bubrenjem u 0,5 mol dm⁻³ otopini NaCl, a najmanji u deioniziranoj vodi (izuzev mikročestica ALG i ALG-KAZ koje su imale manje promjere bubrenjem u 0,1 mol dm⁻³ otopini NaCl. Već spomenuti trend povećanja promjera mikročestica koje sadrže ksantan gumu opažen je i kod bubrenja u otopinama NaCl.

Tablica 7. Promjeri različitih formulacija mikročestica nakon bubrenja u deioniziranoj vodi i otopini HCl. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Sastav formulacija mikročestica i veličina mikrosfrea su naznačeni u tablici.

Velicina mikrosfera	Sastav mikrosfera	Promjer mikročestica (μm)	Promjer mikročestica (μm) H ₂ O	Promjer mikročestica (μm) HCl (pH = 1,54)
1000 μm	ALG	720,8 ± 75,0a	926,0 ± 109,4a	831,4 ± 76,0a
	ALG - XGUM	943,4 ± 106,0b	1577,6 ± 189,3b	1218,6 ± 166,0b
	ALG - KAZ	806,9 ± 96,9c	924,1 ± 105,5a	905,1 ± 96,7c
	ALG - XGUM - KAZ	1115,5 ± 129,1d	1502,5 ± 203,3b	1416,2 ± 160,7d
750 μm	ALG	643,9 ± 79,3e	773,8 ± 101,4c	702,9 ± 76,9e
	ALG - XGUM	871,3 ± 112,3f	1278,6 ± 140,9d	1231,4 ± 141,1b
	ALG - KAZ	708,1 ± 96,6a	839,2 ± 105,2e	820,8 ± 51,2f
	ALG - XGUM - KAZ	964,9 ± 113,2b	1371,0 ± 199,4f	1348,7 ± 111,1g

Vrijednosti označene istim slovom (u koloni) značajno se ne razlikuju (p>0.05; Tukey post-hoc test s Bonferonijevom korekcijom)

Tablica 8. Promjeri različitih formulacija mikročestica (mikrosfere 1000 μm) nakon bubrenja u otopinama NaCl. Sastav formulacija mikročestica i veličina mikrosfera su naznačeni u tablici. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

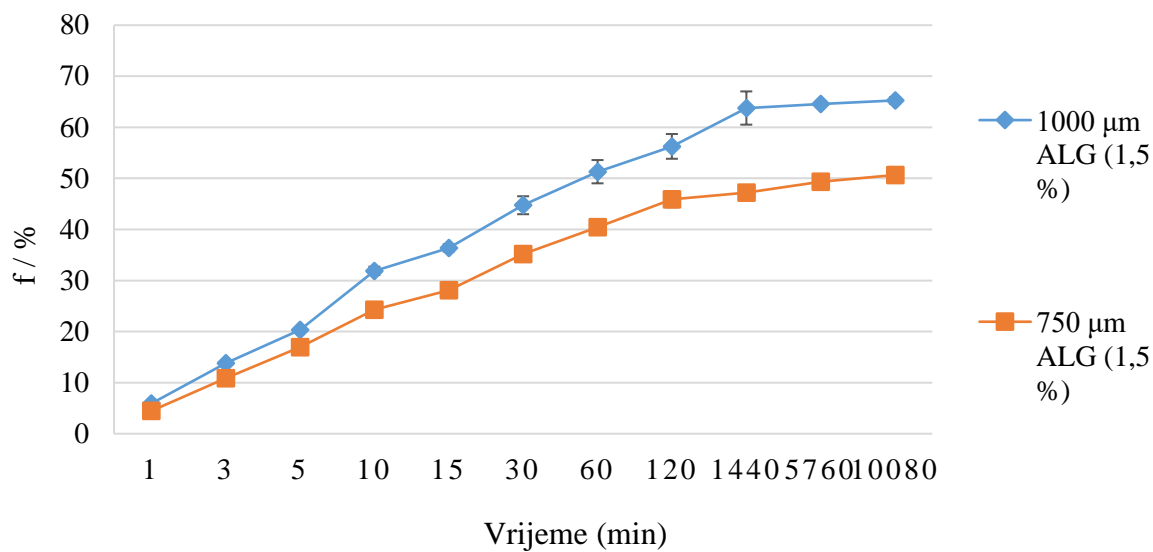
Veličina mikrosfera	Sastav mikrosfera	Promjer mikročestica (μm) 0,1 mol dm^{-3} NaCl	Promjer mikročestica (μm) 0,5 mol dm^{-3} NaCl
1000 μm	ALG	886,0 \pm 81,3a	976,3 \pm 90,8c
	ALG - XGUM	1492,7 \pm 142,3b	1751,5 \pm 163,5e
	ALG - KAZ	971,8 \pm 77,9c	1026,5 \pm 81,5f
	ALG - XGUM -KAZ	1586,9 \pm 139,6d	1889,2 \pm 139,6g

Vrijednosti označene istim slovom (u koloni) značajno se ne razlikuju ($p > 0.05$; Tukey post-hoc test s Bonferonijevom korekcijom)

4.3. *In vitro* otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica

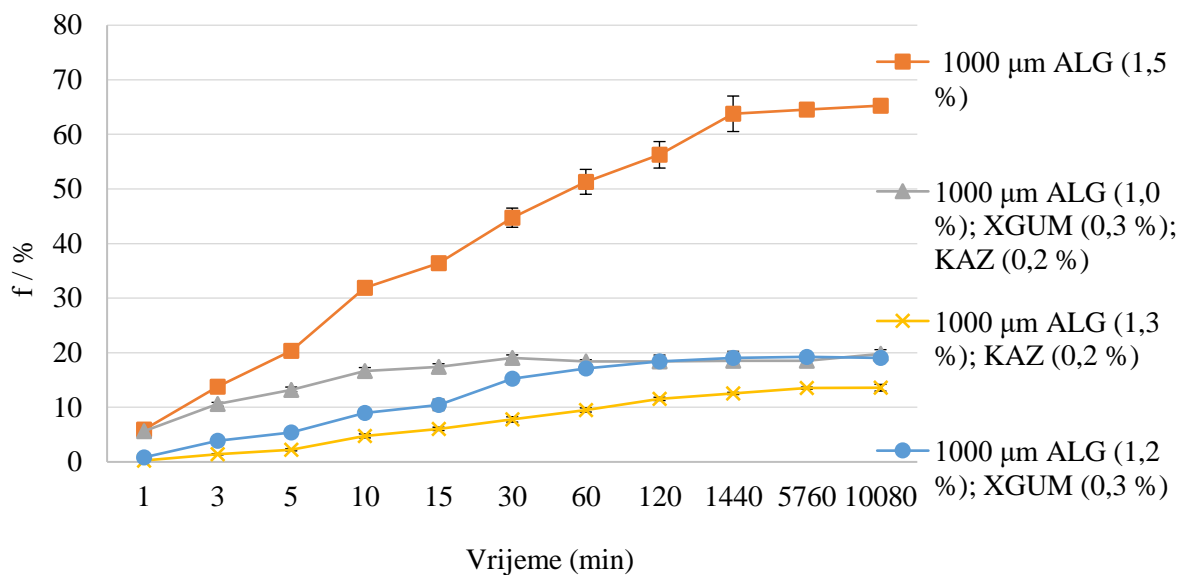
4.3.1. *In vitro* otpuštanje TPC iz mikročestica u deioniziranoj vodi

Profili kumulativnog otpuštanja TPC iz formulacija mikročestica ALG dviju veličina u deioniziranoj vodi prikazani su na Slici 20. Kod dvije veličine mikročestica, uočeno je postepeno otpuštanje TPC te je maksimum postignut u 5760. minuti nakon čega su krivulje dosegle konstantnu vrijednost. Otpuštanje TPC iz većih mikročestica karakteriziraju znatno veće vrijednosti tijekom cijelog vremenskog perioda otpuštanja, a najveća vrijednost iznosila je 65.3 %. Kod mikročestica veličine 750 μm , najveći postotak otpuštenog TPC iznosio je 50,7 %.

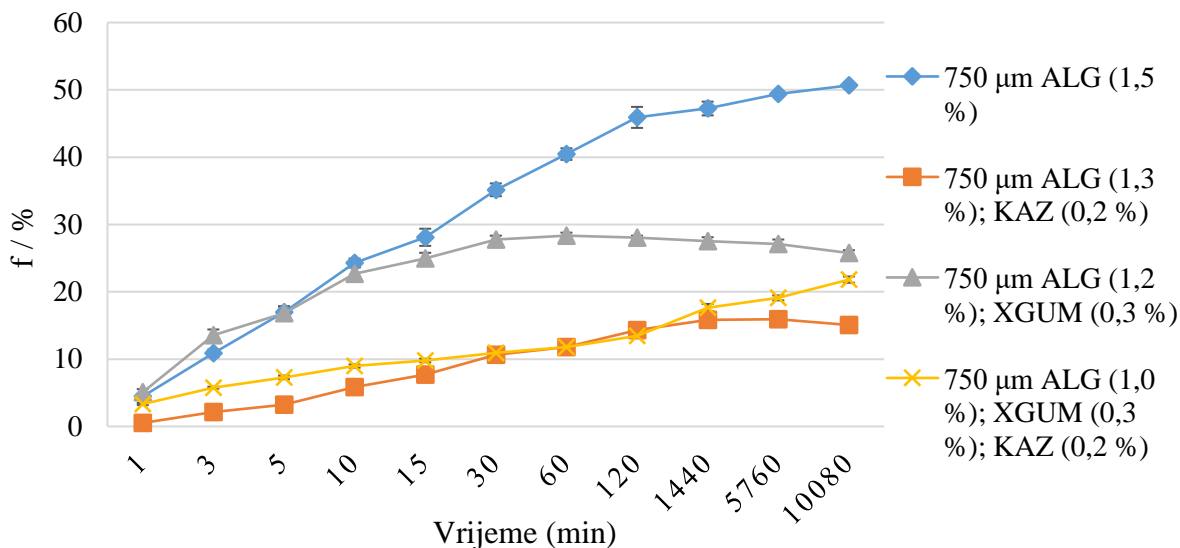


Slika 20. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz formulacija mikročestica ALG dviju veličina mikrosfera u deioniziranoj vodi u ovisnosti o vremenu (t). Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.

Analiziran je i utjecaj dodatka biopolimera u formulaciju mikročestica ALG (izvorne veličine 750 i 1000 μm) na profil otpuštanja TPC u deioniziranoj vodi (Slika 21. i Slika 22.).



Slika 21. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz formulacija mikročestica ALG, ALG-KAZ, ALG-XGUM i ALG-XGUM-KAZ u deioniziranoj vodi u ovisnosti o vremenu (t). Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.



Slika 22. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz formulacija mikročestica ALG, ALG-KAZ, ALG-XGUM i ALG-XGUM-KAZ u deioniziranoj vodi u ovisnosti o vremenu (t). Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.

Najveći postotak otpuštanja TPC u deioniziranoj vodi postignut je formulacijom mikročestica ALG za obje veličine. Najsporije otpuštanje zapaženo je kod formulacije ALG-KAZ čiji maksimum je dosegnut u 5760. minuti te je iznosio 13,5 % (1000 µm) i 15,9 % (750 µm). Formulacije mikročestica ALG-XGUM i ALG-XGUM-KAZ karakterizira vrlo sporo otpuštanje tijekom cijelog perioda mjerenja, a kod formulacija mikročestica ALG-XGUM (veličina mikrosfera 750 µm) uočen je pad otpuštanja TPC nakon 60. minute. Utjecaj veličine mikročestica na količinu otpuštenog TPC u deioniziranoj vodi je neznatan, no nešto veći iznosi su zabilježeni kod manjih mikročestica. Odabir biopolimera nosača na otpuštanje bioaktivnih sastojaka iz mikročestica u deioniziranoj vodi važan je podatak koji ukazuje na mogućnost njihove implementacije u prehrambenim proizvodima.

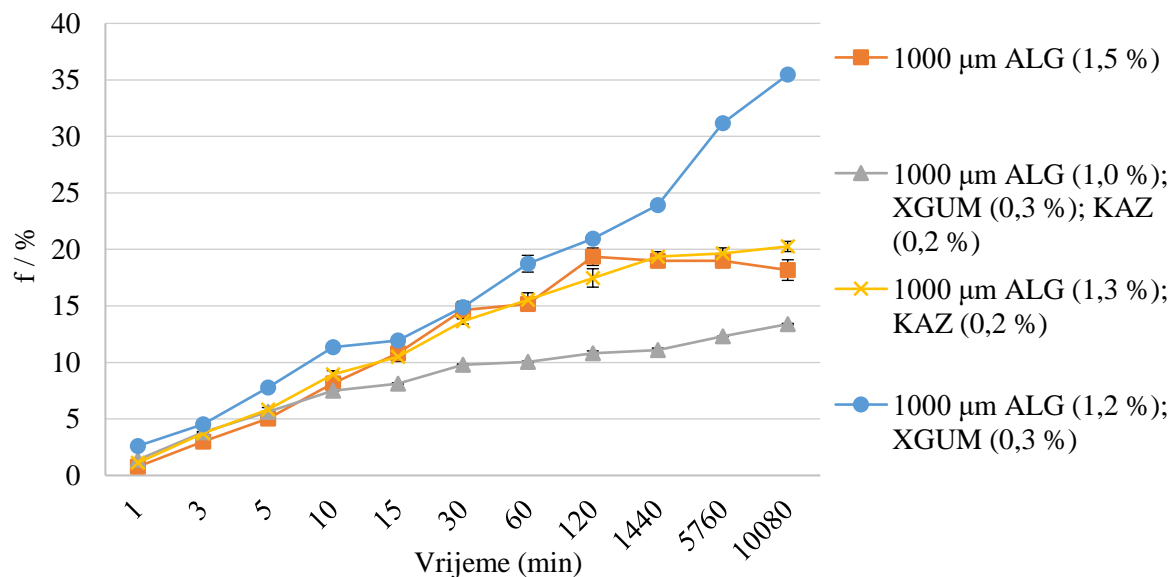
Rezultati primjene Korsmeyer-Peppas modela na otpuštanje TPC iz različitih formulacija mikročestica i veličina u vodi prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Konstante brzine otpuštanja (K/h), eksponenata (n) i koeficijenta korelacije (R^2) za otpuštanje TPC iz različitih formulacija mikročestica u deioniziranoj vodi. Sastav i veličina mikročestica su označeni.

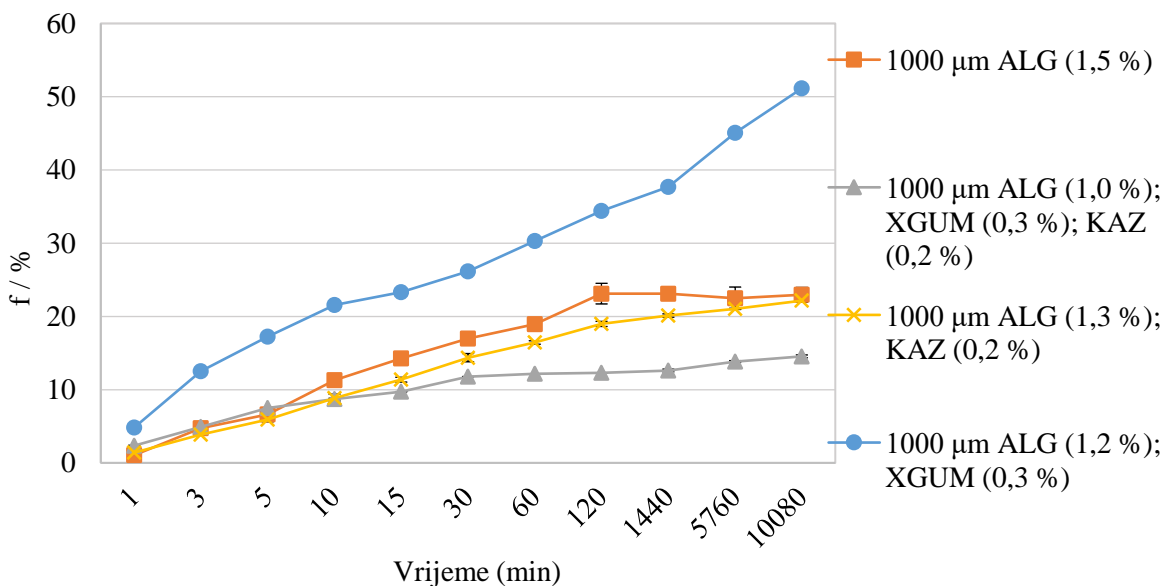
Formulacije mikročestica	K	n	R^2			
				K	n	R^2
		750 μm			1000 μm	
ALG	35,3	0,04	0,99	49,2	0,032	0,99
ALG - KAZ	8,9	0,09	0,98	12,6	0,042	0,99
ALG - XGUM	7,0	0,11	0,99	16,1	0,016	0,99
ALG - KAZ - XGUM	25,8	0,02	0,99	16,5	0,026	0,97

4.3.2. In vitro otpuštanje TPC iz formulacija mikročestica u otopinama natrijeva klorida

Mjerenje je otpuštanje TPC iz različitih formulacija mikročestica u 0,1 i 0,5 mol dm⁻³ otopini NaCl, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 23. i Slici 24. Razlike u profilima otpuštanja (na temelju sastava nosača) u otopinama NaCl nisu uočene te su navedeni iznosi bili manji od 25 % (izuzev ALG-XGUM). Najveće kumulativno otpuštanje TPC postignuto je dodatkom XGUM u formulaciju dok se tropolimerna kombinacija nosača (ALG-KAZ-XGUM) pokazala učinkovitom zbog vrlo niskog kumulativnog otpuštanja (13,4 % u 10 080. minuti disperzijom u 0,1 mol dm⁻³ otopini NaCl te 14,5 % u 0,5 mol dm⁻³ otopini NaCl).



Slika 23. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz formulacija mikročestica ALG, ALG-KAZ, ALG-XGUM i ALG-XGUM-KAZ u 0,1 mol dm⁻³ otopini NaCl u ovisnosti o vremenu (t). Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.



Slika 24. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz formulacija mikročestica ALG, ALG-KAZ, ALG-XGUM i ALG-XGUM-KAZ u 0,5 mol dm⁻³ otopini NaCl u ovisnosti o vremenu (t).

Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.

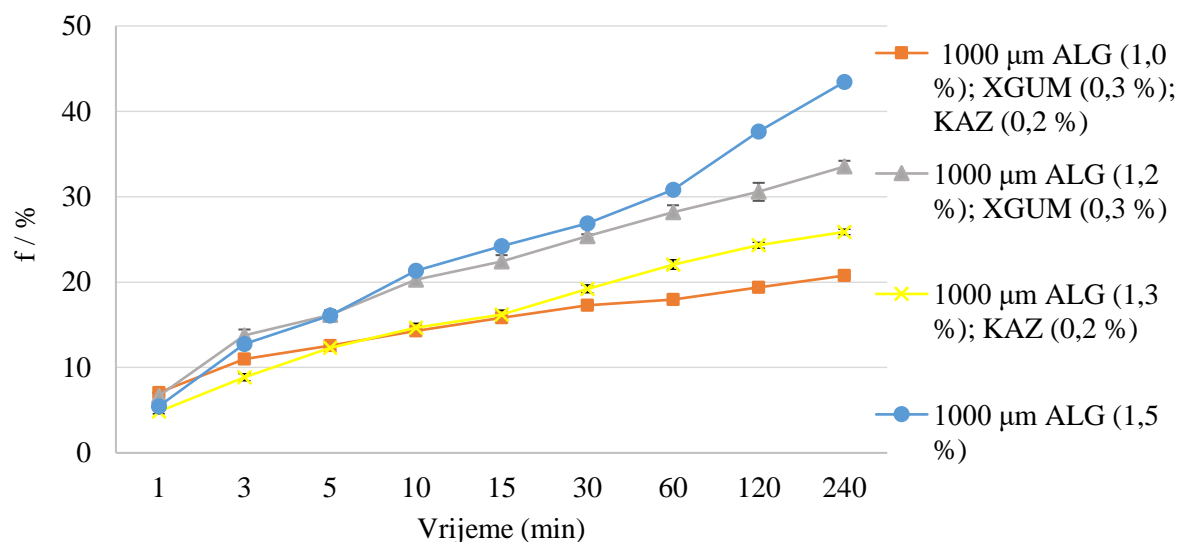
Tablica 10. Konstante brzine otpuštanja (K/h), eksponenata (n) te koeficijenta korelacije (R^2) za otpuštanje TPC iz različitih formulacija mikročestica (1000 μm) u otopinama NaCl. Sastavi formulacija mikročestica su označeni.

Formulacije mikročestica	K	n	R^2	K	n	R^2
		NaCl 0,1 mol dm ⁻³			NaCl 0,5 mol dm ⁻³	
ALG	12,4	0,05	0,98	21,3	0,04	0,98
ALG - KAZ	13,7	0,05	0,99	15,8	0,04	0,99
ALG - XGUM	9,9	0,04	0,99	15,8	0,04	0,98
ALG - KAZ - XGUM	12,5	0,04	0,99	24,5	0,08	0,99

4.3.3. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

4.3.3.1. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u otopini klorovodične kiseline

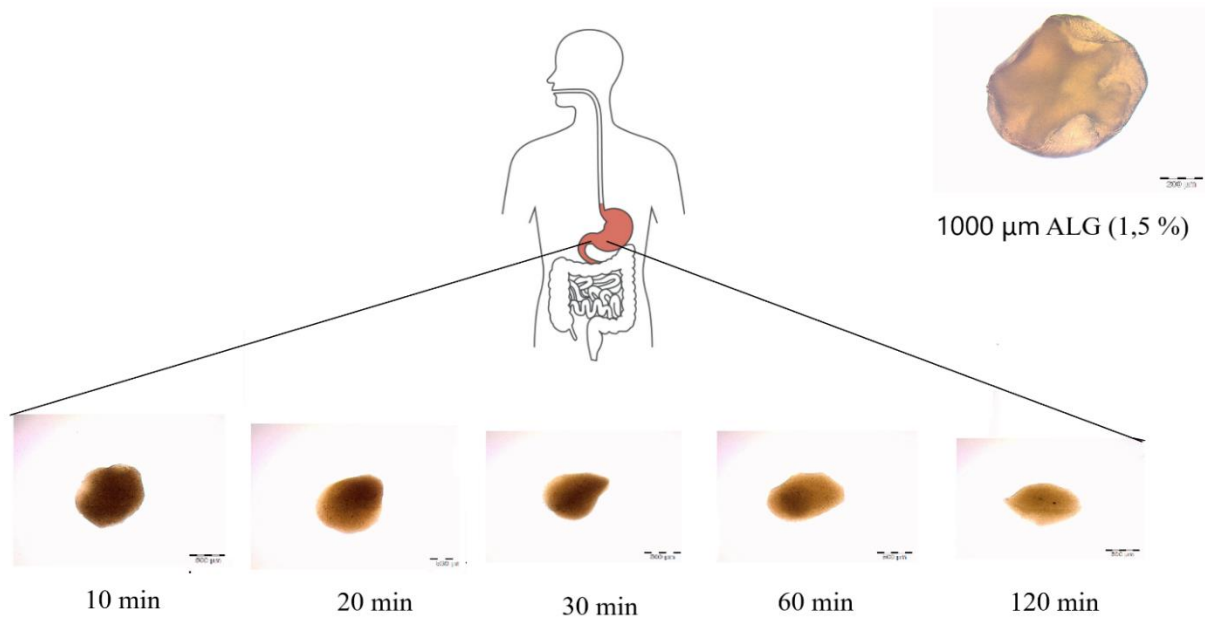
Analizirano je otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola ekstrakta praha lišća stevije iz različitih formulacija mikročestica dviju veličina u otopini HCl (pH= 1,58) i pri temperaturi od $37,0 \pm 0,1$ u reaktoru prikazanom na Slici 9. Eksperimentalni uvjeti simuliraju probavu u želucu čovjeka. Statistički značajne razlike u kumulativnom otpuštanju TPC, između dviju veličina mikročestica na temelju sastava nosača, nisu utvrđene stoga su grafički prikazani samo profili otpuštanja TPC iz mikročestica veličine mikrosfera 1000 μm (Slika 25.).



Slika 25. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz različitih formulacija mikročestica u otopini HCl (pH =1,58) u ovisnosti o vremenu (t). Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.

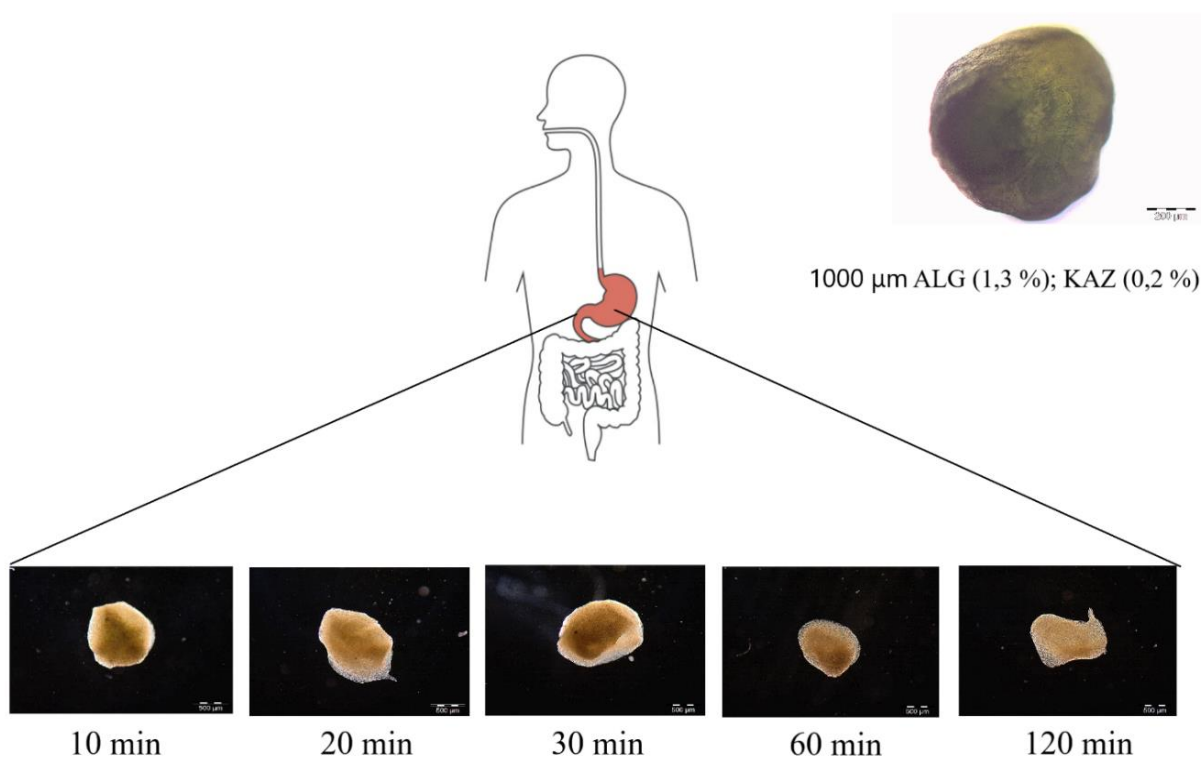
Najveći iznos kumulativnog otpuštanja TPC ostvaren je iz formulacija mikročestica ALG u 240. minuti (43,4 %). Ostale formulacije karakterizira postepeno otpuštanje tijekom cijelog vremenskog perioda mjerenja te su nakon 4 sata izlaganja mikročestica otopini HCl postignuti iznosi od 20,7 do 33,5 %.

Na mikroskopskim fotografijama različitih formulacija mikročestica u simuliranim gastro uvjetima, uočene su deformacije uzrokovane njihovim izlaganjem otopini HCl (Slika 26. do Slika 29.). Raspad mikročestica nije zapažen.



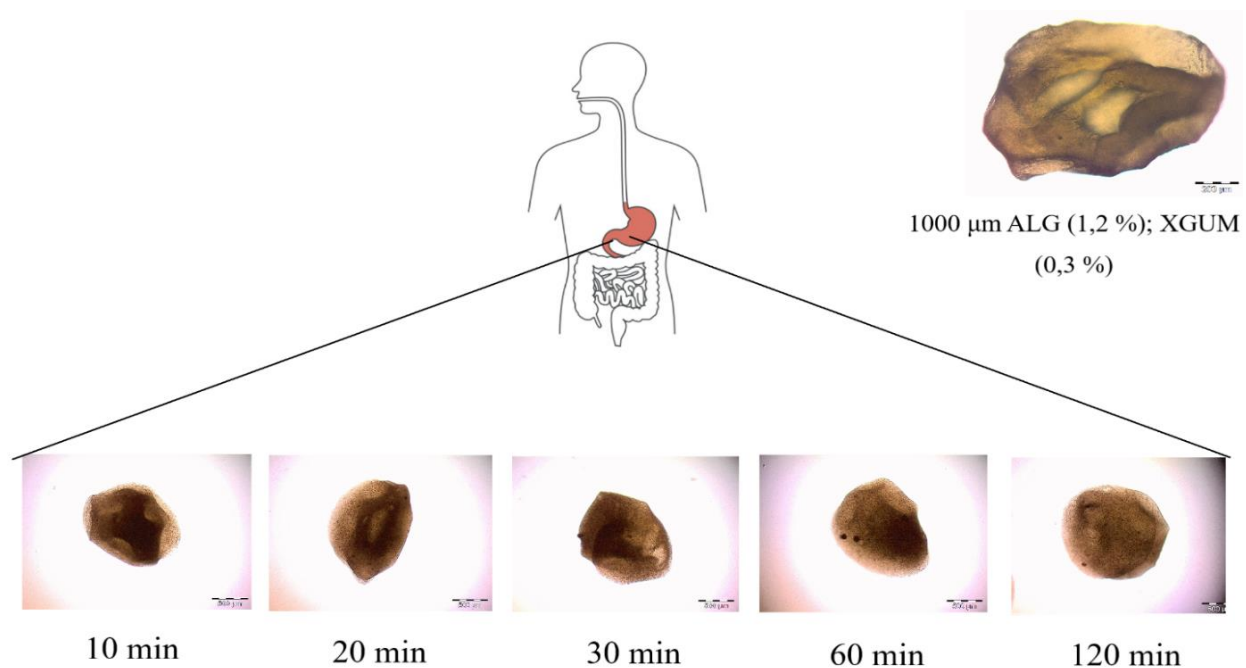
Slika 26. Mikroskopske fotografije formulacije mikročestica ALG u simuliranim gastro uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

(Izvor: Sara Kolar)



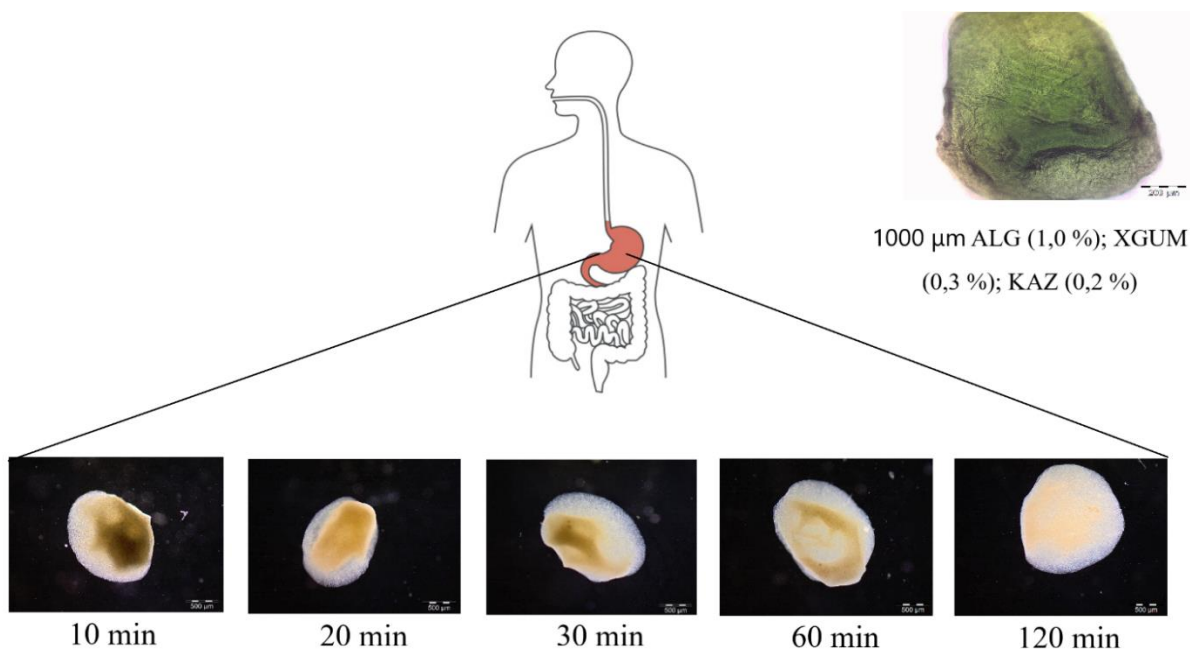
Slika 27. Mikroskopske fotografije formulacije mikročestica ALG-KAZ u simuliranim gastro uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

(Izvor: Sara Kolar)



Slika 28. Mikroskopske fotografije formulacije mikročestica ALG-XGUM u simuliranim gastro uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

(Izvor: Sara Kolar)



Slika 29. Mikroskopske fotografije formulacije mikročestica ALG-XGUM-KAZ u simuliranim gastro uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera.

Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjericila.

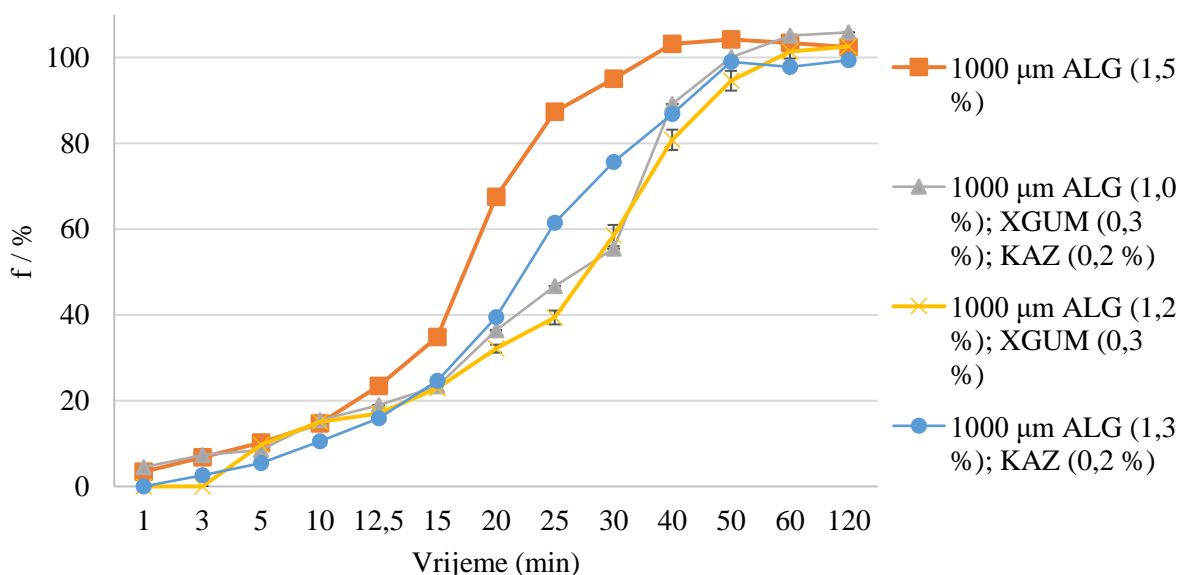
(Izvor: Sara Kolar)

Tablica 11. Konstante brzine otpuštanja (K/h), eksponenata (n) te koeficijenta korelacije (R^2) za otpuštanje TPC iz različitih formulacija mikročestica u otopini HCl ($pH = 1,58$). Sastavi formulacija i veličine mikročestica su označeni.

Formulacije mikročestica	K	n	R^2	K	n	R^2
		750 μm			1000 μm	
ALG	-	-	-	12,9	0,22	0,99
ALG - KAZ	12,4	0,14	0,99	16,8	0,14	0,99
ALG - XGUM	16,1	0,13	0,99	16,1	0,13	0,99
ALG - KAZ - XGUM	19,5	0,09	0,99	12,2	0,10	0,99

4.3.3.2. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u fosfatnom puferu

Testirano je otpuštanje TPC iz različitih formulacija mikročestica u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,01$) i pri temperaturi od $37,0 \pm 0,1$ u reaktoru prikazanom na Slici 9. Eksperimentalni uvjeti simuliraju intestinalnu probavu čovjeka. Na Slici 30. prikazani su rezultati otpuštanja TPC iz formulacija većih mikročestica.

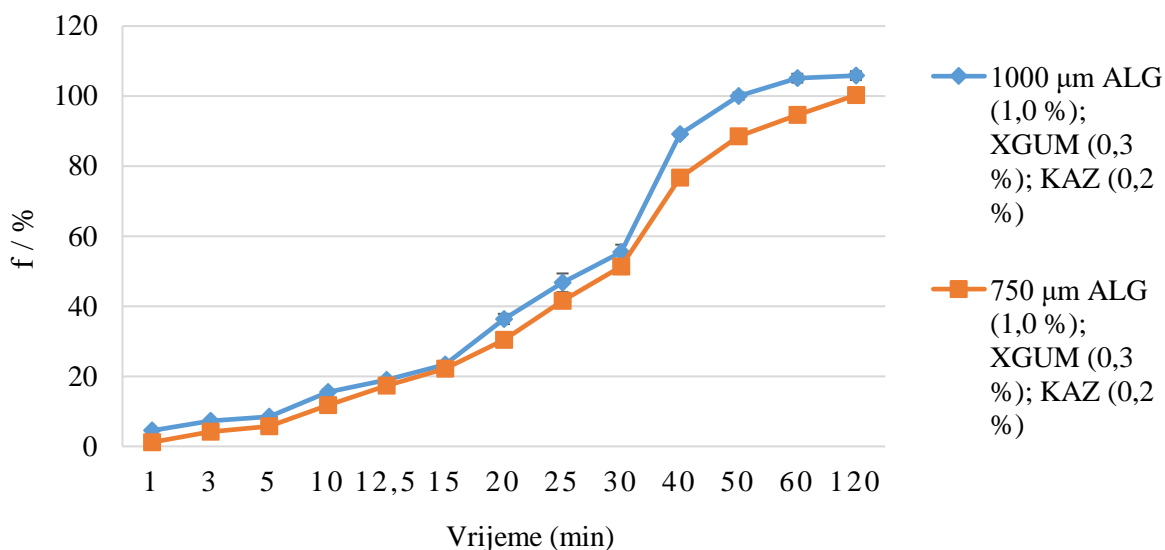


Slika 30. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz različitih formulacija mikročestica u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,01$) u ovisnosti o vremenu (t). Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.

Postepeno otpuštanje do 15. minute te vrlo brzo otpuštanje TPC s maksimumom (100 %) postignutim u 40. minuti, uočeno je kod formulacije mikročestica ALG. Formulacije mikročestica ALG-XGUM-KAZ te ALG-XGUM sporije otpuštaju sa 100 % postignutim između 50. i 60. minute, dok formulacija mikročestica ALG-XGUM počinje otpuštati TPC tek u 5. minuti.

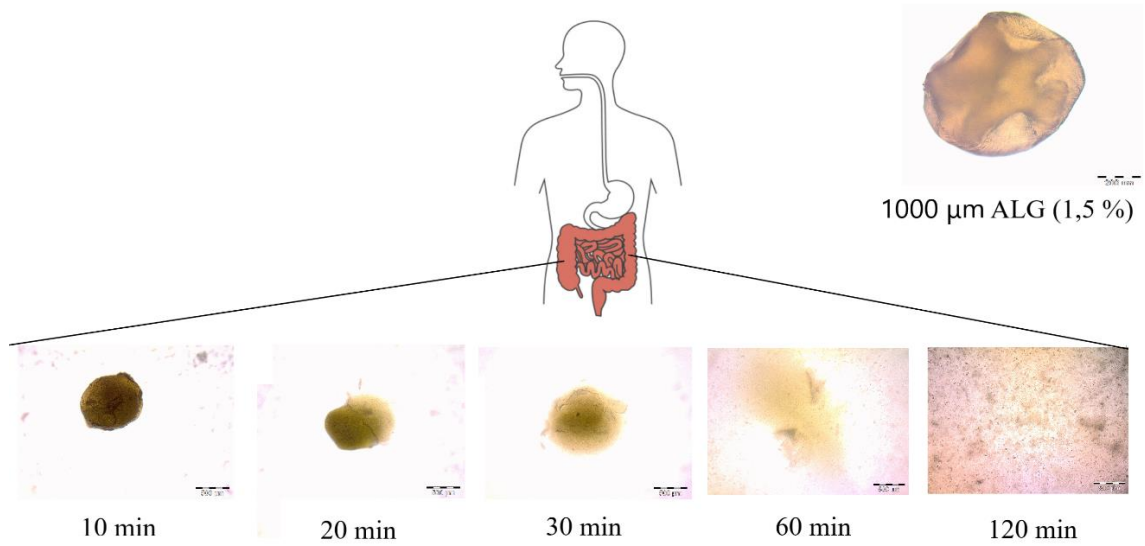
Nešto više izmjerene f vrijednosti i brže otpuštanje tijekom eksperimenta opaženo je kod većih mikročestica. Za veće mikročestice je 100 % otpuštanje izmjereno u 50. minuti, dok su manje mikročestice 100 % otpuštanje postigle tek u 120. minuti. Statistički malo veće razlike u

otpuštanjima TPC iz formulacija mikročestica ALG-KAZ-XGUM različitih veličina prikazane su na slici 31. (Slika 31.).



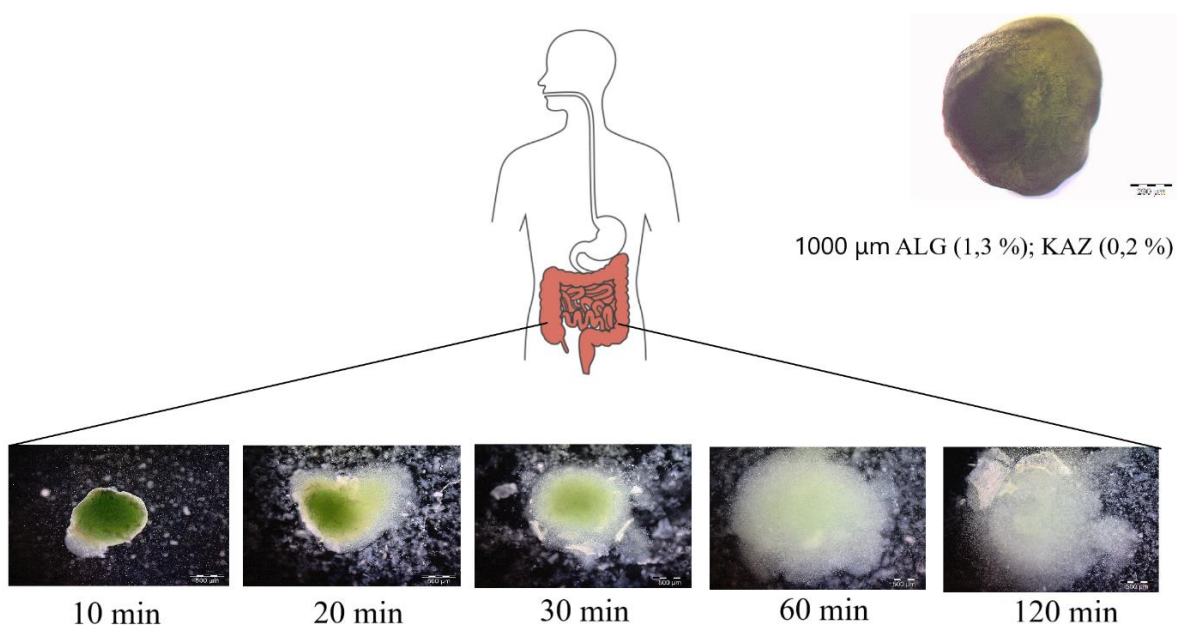
Slika 31. Grafički prikaz frakcije otpuštenog TPC (f) iz formulacija mikročestica ALG-XGUM-KAZ u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,01$) u ovisnosti o vremenu (t). Oznake na grafu odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.

Na mikroskopskim fotografijama (Slika 32. do Slika 35.) prikazane su morfološke promjene svih formulacija većih mikročestica, početak raspada između 10. i 20. minute te oslobađanje ekstrakta lišća stevije u okolni medij. Potpuni raspad mikročestica vidljiv je na fotografijama snimljenim u 60. minuti.



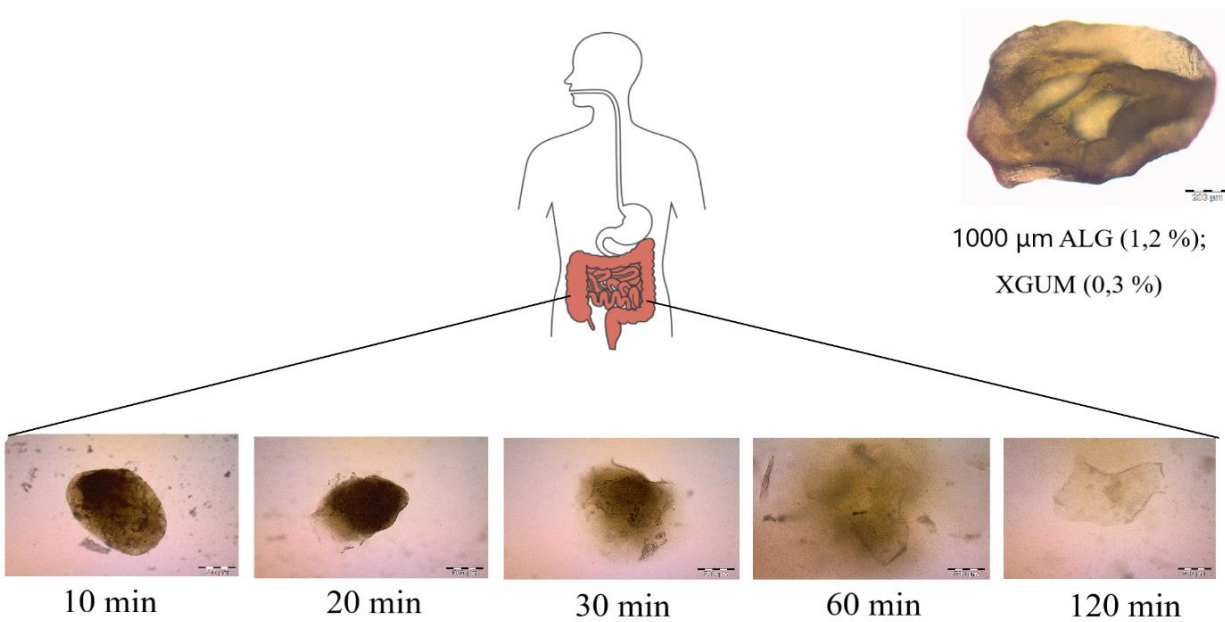
Slika 32. Mikroskopske fotografije promjena formulacije mikročestica ALG u simuliranim intestinalnim uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

(Izvor: Sara Kolar)



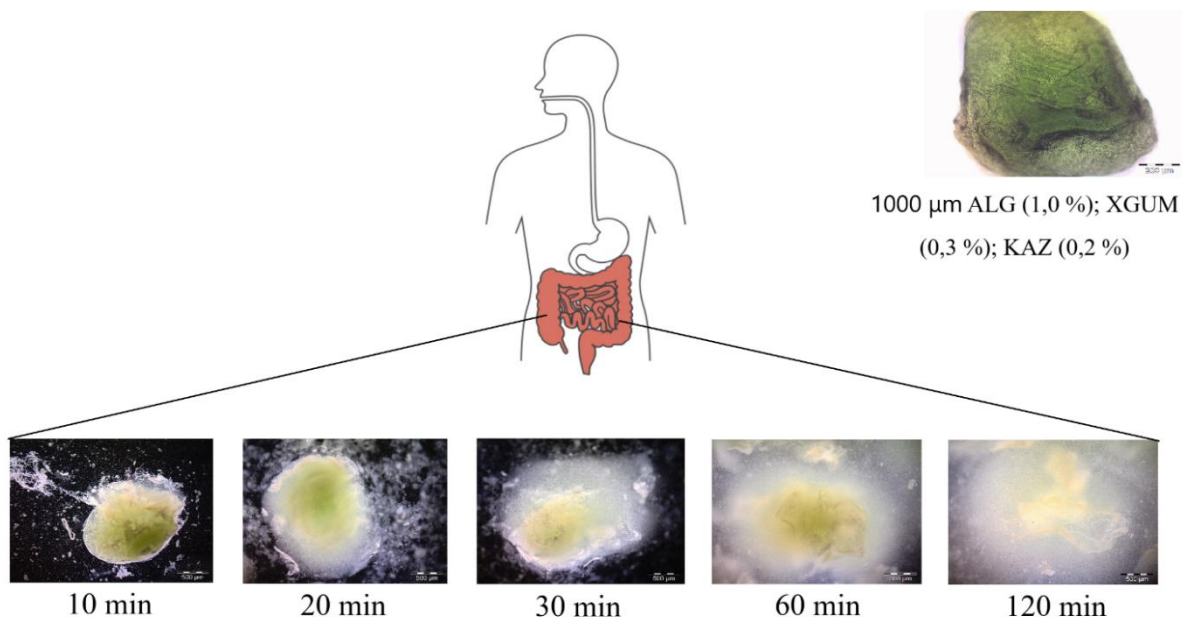
Slika 33. Mikroskopske fotografije promjena formulacije mikročestica ALG-KAZ u simuliranim intestinalnim uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

(Izvor: Sara Kolar)



Slika 34. Mikroskopske fotografije promjena formulacije mikročestica ALG-XGUM u simuliranim intestinalnim uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

(Izvor: Sara Kolar)



Slika 35. Mikroskopske fotografije promjena formulacije mikročestica ALG-XGUM-KAZ u simuliranim intestinalnim uvjetima tijekom 120 minuta. Oznake na slici odnose se na veličinu i sastav mikrosfera. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila .

(Izvor: Sara Kolar)

Tablica 12. Konstante brzine otpuštanja (K/h), eksponenata (n) te koeficijenta korelacije (R^2) za otpuštanje TPC iz različitih formulacija mikročestica u fosfatnom puferu ($pH = 7,40$). Sastavi formulacija i veličine mikročestica su označeni.

Formulacije mikročestica	K	n	R^2	K	n	R^2
		750 µm			1000 µm	
ALG	70,6	0,09	0,98	84,7	0,17	0,99
ALG - KAZ	52,1	0,18	0,99	59,3	0,11	0,99
ALG - XGUM	52,9	0,13	0,999	68,2	0,08	0,99
ALG - KAZ - XGUM	51,4	0,18	0,98	51,6	0,15	0,99

5. RASPRAVA

Rasprava je, kao i rezultati, podijeljena u dva dijela. U prvom dijelu raspravljen je postupak optimizacije ultrazvukom potpomognute ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni, a u drugom dijelu fizikalno – kemijska svojstva mikrosfera i mikročestica s inkapsuliranim optimiziranim ekstraktom stevije kao jezgrom te *in vitro* otpuštanja ukupnih polifenola iz formulacija mikročestica u različitim otopinama.

5.1. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni

U ekstrakciji, prvom koraku izolacije polifenola iz biljnog materijala, bitno je odabrati učinkovitu ekstrakcijsku metodu i odrediti optimalne uvjete pri kojima se postiže maksimalan ekstrakcijski prinos te osigurava stabilnost polifenola. Zbog već spomenutih prednosti (ekološki prihvatljiva metoda primjenjiva kod obnovljivih biljnih resursa, visoke reproducibilnosti, visokog ekstrakcijskog prinosa bioaktivnih sastojaka uz redukciju ekstrakcijskog vremena i volumena otapala, sigurna i ekonomična te jednostavna za rukovanje) (Dent i sur., 2015; Chemat i sur., 2017; Medina – Torres i sur., 2017), kao metoda ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni, korištena je ultrazvučna ekstrakcija. Iako su se binarni sustavi otapala (npr. otopina etanola i deionizirane vode) pokazali učinkovitijima u ekstrakciji različitih bioaktivnih sastojaka od samostalnih otapala zbog različite polarnosti (Dent i sur., 2015; Medina – Torres i sur., 2017), u ovom istraživanju korištena je deionizirana voda kao netoksično, sigurno i ekološki prihvatljivo ekstrakcijsko otapalo. Pобољшanje učinkovitosti ekstrakcije (korištenjem deionizirane vode) moguće je postići manipulacijom ekstrakcijske temperature i ekstrakcijskog vremena. Prema Vergara-Salinas i sur. (2012), polarnost vode značajno se smanjuje povećanjem temperature (razaranje vodikovih veza) i dužim vremenom ekstrakcije čime se dostiže ekstrakcijska učinkovitost bioaktivnih sastojaka usporediva s binarnim sustavom otapala. Ujedno, pri višim temperaturama vrijednosti viskoznosti i površinske napetosti vode su niže što uzrokuje povećanje transporta mase bioaktivnog sastojka iz uzorka.

Ultrazvučna ekstrakcija ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni provedena je prema eksperimentalnom dizajnu prikazanom u tablici 2. Zapaženi veći ekstrakcijski prinosi ukupnih polifenola (TPC), primjenom viših koncentracija otopine stevije (5 g/L, 6 g/L i 7 g/L) i pri višoj amplitudi (75), posljedica su većeg transporta mase i brže difuzije zbog nižeg

omjera sastojak/otapalo (Dobrinčić i sur., 2020). Jednaka opažanja o utjecaju viših koncentracija otopine uzorka na udio ekstrahiranih TPC iz lišća masline ultrazvučnom ekstrakcijom utvrdili su Dobrinčić i sur. (2020). Ekstrakcija pri višoj amplitudi uzrokuje povišenje temperature (Abugabr Elhag i sur., 2018) što rezultira indukcijom rupture stanične stijenke i povećanjem topljivosti sastojka u otapalu te povećanjem transporta mase (Medina – Torres i sur., 2017). Veći ekstrakcijski prinosi TPC iz praha lišća stevije, primjenom više amplitude, zapaženi su i u istraživanju (Živković Pajač i sur., 2020).

Iako je najveća koncentracija TPC-a (543,947 mg EKG/L) postignuta ekstrakcijom pri amplitudi 75, koncentraciji otopine stevije iznosa 7 g/L i u trajanju od 9 minuta, kada se uzme u obzir iskorištenje ekstrakcije (omjer praha stevije, odnosno suhe tvari i ekstrahiranih polifenolnih spojeva) ekstrakcija ukupnih polifenola pri amplitudi iznosa 75, koncentraciji od 6 g/L i u trajanju od 9 minuta pokazala se optimalnom što je u skladu s rezultatima istraživanja (Živković Pajač i sur., 2020) ekstrakcija ukupnih polifenola pri amplitudi iznosa 75, koncentraciji od 6 g/L i u trajanju od 9 minuta pokazala se optimalnom što je u skladu s rezultatima istraživanja (Živković Pajač i sur., 2020). Slični rezultati optimalnog ekstrakcijskog vremena opaženi su u ultrazvučnoj ekstrakciji ukupnih polifenola iz kadulje (*Salvia officinalis* L.) (Dent i sur., 2015) te sjemenki i kore nara (Rajha i sur., 2020) iznosa 10 minuta, a prolongiranjem ultrazvučnog tretmana nije se povećao ekstrakcijski prinos. Šic Žlabur i sur. (2015) utvrdili su kako je optimalno vrijeme ultrazvučne ekstrakcije TPC iz praha lišća stevije (korištenjem deionizirane vode kao otapala te koncentracije otopine iznosa 2,5 g/L) također postignuto u 10. minuti (sonde promjera 7 i 22 mm). Dent i sur. (2015) navode kako, ovisno o biljnom materijalu, optimalno vrijeme ultrazvučne ekstrakcije polifenola ne bi trebalo biti duže od 15 minuta. Dužim ekstrakcijskim vremenom uzorak je duže u kontaktu s otapalom (što olakšava difuziju ciljanih spojeva (Dobrinčić i sur., 2020)), no posljedično dolazi do porasta temperature. Na temperaturama višim od 100 °C (Galili i Hovav, 2014) dolazi do degradacije i mijenjanja konformacije polifenola zbog njihove termosenzibilnosti (Galili i Hovav, 2014; Dent i sur., 2015; Medina – Torres i sur., 2017; Dobrinčić i sur., 2020; Rajha i sur., 2020).

5.2. Fizikalno – kemijska karakterizacija mikrosfera

Polifenoli su vrlo osjetljivi spojevi podložni degradaciji djelovanjem topline, svjetla itd. stoga je važno osigurati njihovu stabilnost i intaktnost tijekom skladištenja i upotrebe u prehrambenoj industriji. Inkapsulacija polifenola metodom ionskog geliranja, upotrebom različitih biopolimera kao materijala nosača, pokazuje potencijal u očuvanju stabilnosti i funkcionalnosti te povećanju biodostupnosti polifenola uz postizanje ciljanog i kontroliranog otpuštanja.

5.2.1. Efikasnost i kapacitet inkapsulacije i suha tvar

Raspon efikasnosti inkapsulacije TPC, kod pripreve većih mikrosfera, iznosio je 106 do 118 %, dok je kod manjih raspon EE iznosio 111 do 121 %. Visoki iznosi (iznad 100 %) posljedica su dodatka optimiziranog ekstrakta praha lišća stevije u otopinu nosača i otopinu CaCl_2 (Slika 7.). Navedena procedura provedena je kako bi se nadvladali gubitci polifenola uzrokovani njihovom difuzijom iz mikrosfera tijekom procesa ionskog geliranja te kako bi se povećala efikasnost inkapsulacije (Živković Pajač i sur., 2020).

Efikasnost i kapacitet inkapsulacije ovise o fizikalnim i kemijskim svojstvima materijala nosača, metodi inkapsulacije te o svojstvima inkapsuliranog sastojka (Saruchi i sur., 2020). Kod pripreve mikrosfera različitih veličina, uočeno je da se dodatkom biopolimera u formulaciju uz smanjenje udjela natrijevog alginata povećavaju efikasnost i kapacitet inkapsulacije polifenola u svim formulacijama izuzev formulacije mikrosfera ALG-XGUM (izmjerene su najmanje vrijednosti efikasnosti i kapaciteta inkapsulacije). Proporcionalna veza između dodatka biopolimera u formulaciju te kapaciteta i efikasnosti inkapsulacije u skladu je s literaturnim podacima (Belščak-Cvitanović i sur., 2016a, 2016b; Bušić i sur., 2016, 2018; Norudin i sur., 2018). Biopolimeri se ponašaju kao svojevrsna barijera koja ometa transport polifenola iz pora mikrosfera čime je količina inkapsuliranih polifenola veća, a samim time i veći iznosi EE te LC. Kao moguće objašnjenje znatno većih iznosa EE i LC kod formulacija mikročestica ALG-KAZ i ALG-XGUM-KAZ, Belščak-Cvitanović i sur. (2016a) navode veću viskoznost otopine nosača te kemijske interakcije između proteina (KAZ) te polisaharida (ALG i XGUM) i polifenola koja omogućuje kemijsko „zadržavanje“ polifenola unutar mikrosfera. Najmanji iznosi EE i LC, opaženi kod ALG-XGUM, posljedica su velikog broja hidroksilnih skupina u strukturi XGUM koje uzrokuju veće vezanje molekula vode vodikovim vezama, a posljedično manje kompaktnom strukturom mikrosfera (Lutfi i sur., 2019; Hajaratul i sur., 2020).

Statistički značajne razlike u EE i LC, između mikrosfera različitih veličina, mogu se pripisati uvjetima te tehničkoj nepreciznosti tijekom inkapsulacije zbog male razlike u iznosima. Sastav formulacije mikrosfera ima značajniji utjecaj na EE i LC od veličine mlaznice korištene pri procesu inkapsulacije.

Količina suhe tvari, za sve formulacije mikrosfera iznosila je 2.8 - 3.2 % bez statistički značajnih razlika u odnosu na sastav ili veličinu mikrosfera. Jednako su utvrdili Bušić i sur. (2016) te Belščak-Cvitanović i sur. (2016a). Velika količina vode u mikrosferama, posljedica je strukture trodimenzionalne mreže hidrogela.

5.2.2. Stupanj bubrenja

Hidrofilni biopolimeri imaju sposobnost bubrenja i zadržavanja značajne količine vode unutar svoje mrežaste strukture bez otapanja i nazivaju se hidrogeli (Sharpe i sur., 2014; Ahmed, 2015). Proces bubrenja mikročestica hidrofilnih biopolimera uključuje dva temeljna molekulska procesa (Siepmann i Siepmann 2012):

- (i) prodiranje otopine u mikročesticu
- (ii) relaksaciju polimernih lanaca (prijelaz staklaste strukture u gumasto stanje).

Sposobnost apsorpcije velike količine vode proizilazi iz hidrofilnih funkcionalnih skupina vezanih za polimernu okosnicu, a netopljivost iz umrežavanja između lanaca mreže polimera (Ahmed, 2015). Uobičajeno je da, u nabubrenom stanju, maseni udio vode u hidrogelu znatno veći od masenog udjela polimera. Promjena volumena hidrogela (smanjenje ili povećanje) odgovor je na razne kemijske i fizikalne stimulanse, kao što su pH vrijednost i sastav otopine u kojoj se nalaze (Ahmed, 2015).

Dispergiranjem u vodi mikročestice hidrogela se rehidriraju, voda prodire kroz pore na površini uzrokujući bubrenje bez erozije ili raspadanja (Segale i sur., 2016). Zbog poroznosti uzrokovane sušenjem mikrosfera te djelovanjem osmotskog tlaka, dolazi do relaksacije polimerne mreže te „popunjavanja praznina“ unutar dijelova mikročestica vodom što rezultira njihovim bubrenjem (Bušić i sur., 2018; Nikoo i sur., 2018). Stupanj bubrenja mikročestica hidrogela ograničen je opsegom umrežavanjem, voda teže prodire u gušće strukture te se S_w koristi za procjenu gustoće strukture mikročestica (Roger i sur. 2006).

Opaženi znatno veći stupnjevi bubrenja formulacija mikročestica koje su sadržavale ksantan gumu, u deioniziranoj vodi, otopini HCl te otopinama NaCl, posljedica su hidrofilnih svojstava ksantan gume zbog čega može apsorbirati znatno više vode od svoje težine (Lutfi i sur., 2019), posljedično slabijem opsegu umreženosti polimernih lanaca. Iz navedenog razloga, stupnjevi bubrenja formulacija mikročestica prelaze iznose od 100 %. Jednako su utvrdili (Pongjanyakul i Puttipatkachorn, 2007) inkapsulacijom diklofenak natrija u mikročestice ALG-XGUM. Detektirana statistički značajna razlika između bubrenja formulacija mikročestica ALG i ALG-KAZ u deioniziranoj vodi može se pripisati i većoj viskoznosti otopine nosača (dodatkom otopljenog kazeina) te njezinom težem prolasku kroz mlaznicu veličine 750 μm .

Manji iznosi S_w svih formulacija mikročestica u otopini HCl posljedica su proton – kalcij ionske izmjene između kalcijeva alginata (formirane mikrosfere) i otopine HCl što rezultira nastajanjem netopljive alginske kiseline te težim prolaskom vode kroz pore nastale sušenjem (Patel i sur., 2016).

Usporedbom rezultata bubrenja pripremljenih formulacija mikročestica u deioniziranoj vodi te otopinama NaCl, uočen je trend povećanja S_w povećanjem koncentracije NaCl. Jednako su utvrdili (Bajpai i Sharma, 2004) izlaganjem mikročestica kalcijeva alginata otopinama NaCl različitih koncentracija te navode kako, zbog nedovoljnog vezanja natrijevih kationa za $-\text{COO}^-$ skupinu natrijeva alginata (tijekom ionske izmjene između natrijevih i kalcijevih iona), smanjuje se opseg umrežavanja dok se apsorpcija vode povećava.

5.2.3. Morfologija i veličina mikrosfera

Morfološke karakteristike mikročestica ovise o sastavu materijala nosača te uvjetima inkapsulacije (promjer mlaznice, frekvencija, amplituda, protok itd.) (Belščak – Cvitanović i sur., 2015). Sušenje mikrosfera uzrokovalo je morfološke promjene, odnosno gubitak sferičnog oblika te pojavu heterogenosti površine (Slika 11.) što je u skladu s literaturnim podacima (Bušić i sur., 2018; Hajaratul i sur., 2020, Živković Pajač i sur., 2020). Mikroskopske fotografije mikrosfera (Slika 11.) pokazuju velike količine zadržane vode iz reakcijskog medija koja se gubi sušenjem, površina postaje hrapava s nepravilnim borama uslijed amanjenja napreznja lanaca biopolimera (Giri i sur., 2016; Reddy i sur., 2020). Pora i udubljenja koje se jasno prikazuju na SEM fotografijama (Slika 12. do slika 15.) omogućuju bubrenje i *in vitro* otpuštanje ukupnih polifenola (Maiti i sur., 2009; Patel i sur., 2016). Nabori, udubljenja i uzvišenja najizraženiji su kod formulacija mikročestica

ALG (Slika 12.). Jednaka opažanja utvrđena su u istraživanju Jurića i sur. (2020b). Manji nabori opaženi su kod formulacija mikročestica ALG-XGUM (Slika 13.) zbog kompleksnog međudjelovanja biopolimera u matričnoj strukturi (Jithendra i sur., 2020). Zadržavanje sferičnog oblika formulacija mikročestica ALG-KAZ i glatka površina bez velikih udubljenja (Slika 14.) u skladu su s literaturnim podacima (Blandón i sur., 2016). Najveći stupanj homogenosti površine opažen je u formulaciji mikročestica ALG-KAZ-XGUM (Slika 15.) zbog inkorporacije kazeina kravljeg mlijeka koji, prema Wangu i sur. (2017) smanjuje poroznost i poboljšava integritet strukture.

Dominantni pikovi kisika, detektirani kod svih formulacija mikročestica elementarnom kemijskom analizom površine mikročestica (EDS) (Slika 16. do Slika 19.), ukazuju na prisutnost hidroksilnih skupina molekula polimera (Jithendra i sur., 2020).

Promjeri različitih formulacije mikročestica dviju veličina (Tablica 7.), određeni su mikroskopskom analizom. Velike razlike kao i trend povećanja promjera opažen je kod mikročestica pripremljenih iz smjesa biopolimera. Dodatkom biopolimera u otopinu natrijevog alginata povećava se viskoznost otopine te nastaju veće mikrosfere u kontaktu s otopinom kalcijeva klorida. Kod formulacije mikročestica ALG-KAZ-XGUM za obje veličine i manjih mikročestica ALG-XGUM promjeri su bili veći od odgovarajućih mikrosfera. Jednako su utvrdili Patel i sur. (2016) inkapsulacijom ceftriakson natrija te korištenjem karboksimetil celuloze, arabika gume, hidroksipropil metilceluloze i drugih biopolimera kao materijala nosača.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su postojanje proporcionalne veze između veličine nakon bubrenja i strukture mikročestica. Opaženi znatno veći stupnjevi bubrenja formulacija koje su sadržavale ksantan gumu u deioniziranoj vodi, otopini HCl te otopinama NaCl rezultirali su i njihovim znatno većim promjerima nakon bubrenja zbog manje gustoće umrežavanja i međudjelovanja konstituenta mikročestice s medijem u kojem bubri. Manji stupnjevi bubrenja svih formulacija i veličina mikročestica u otopini HCl odrazili su se proporcionalno i na promjer mikročestica nakon bubrenja. Usporedba veličina različitih formulacija mikročestica nakon bubrenja u deioniziranoj vodi te otopinama NaCl pokazala je najveće vrijednosti S_w bubrenjem u $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ otopini NaCl, a najmanje u deioniziranoj vodi (izuzev formulacije mikročestica ALG i ALG-KAZ kojima su izmjereni manji promjeri bubrenjem u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopini NaCl) što je u skladu s izmjerenim S_w vrijednostima.

5.3 *In vitro* otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica

Dispergiranjem formulacija mikročestica u vodi ili nekom drugom otapalu, hidrofilne polimerne mikročestice bubre utječući na oslobađanje inkapsuliranih sastojaka. Razni fizikalno-kemijski procesi kao što su vlaženje, bubrenje (prodor otopine u mikročesticu) i opuštanje polimernog naprezanja (prijelaz staklaste strukture u gumasto stanje), difuzija kroz mikročesticu, raspadanje, otapanje ili erozija strukture te njihove kombinacije, mogu biti uključeni u otpuštanje inkapsuliranog sastojka iz biopolimerne mikročestice (Patel i sur., 2016; Bušić i sur., 2018). Mehanizam otpuštanja aktivnih komponenata primarno ovisi o karakteristikama materijala jezgre i aktivne komponente kao i o veličini mikročestice. Najvažniji kontrolni mehanizmi otpuštanja iz hidrofilnih mikročestica su bubrenje i otapanje/erozija na površini mikročestice (Siepmann i Siepmann, 2013).

Utvrđivanje utjecaja otopina različitih pH vrijednosti na kinetiku i mehanizme otpuštanja inkapsuliranog polifenola praha lišća stevije iz mikročestica važno je zbog njihove potencijalne primjene u prehrambenoj industriji. Kinetika i mehanizmi otpuštanja TPC u deioniziranoj vodi, otopinama NaCl i simuliranim gastrointestinalnim uvjetima iz formulacija mikročestica različitih veličina analizirani su korištenjem jednostavnog empirijskog Korsmeyer-Peppas modela (Korsmeyer i sur., 1983),

$$f = Kt^n$$

gdje je K kinetička konstanta karakteristična za određeni sustav s obzirom na strukturne i geometrijske parametre, n je eksponent oslobađanja koji predstavlja mehanizam oslobađanja, a t je vrijeme oslobađanja.

Prema Korsmeyer–Peppas modelu, eksponent otpuštanja n može se opisati s tri različita mehanizma (Fickovom difuzijom, ne-Fickovom difuzijom ili Tip II transportom). Vrijednosti $n < 0.43$ ukazuju da je otpuštanje kontrolirano s klasičnom Fickovom difuzijom. Za $n > 0.85$ otpuštanje je kontrolirano s Tip II transportom (proces uključuju bubrenje i relaksaciju polimernog matriksa), dok vrijednosti n između 0.43 i 0.85 pokazuju anomaliju u kinetici transporta koja se opisuje kao kombinacija dva mehanizma difuzije i Tip II transporta.

5.3.1. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u deioniziranoj vodi

Profil otpuštanja ukupnih polifenola (TPC) iz formulacija mikročestica ALG u deioniziranoj vodi karakterizira postepeno kumulativno otpuštanje s maksimalnim iznosima od 65,27 % (veličina 1000 μm) i 50,66 % (veličina 750 μm) postignutim u 5760. minuti. Manja količina otpuštenog TPC iz manjih čestica u skladu je s manjim stupnjem njihova bubrenja u deioniziranoj vodi. Opaženi visoki postotci kumulativnog otpuštanja upućuju na nepoželjnu implementaciju formulacija mikročestica u prehrambenim proizvodima visokog sadržaja vode. Primjenom smjese biopolimera, kao materijala nosača u formulacijama mikročestica za obje veličina, smanjuje se frakcija otpuštenog TPC. Patel i sur. (2016), kao objašnjenje, navode povećanje viskoznosti otopine nosača, stvaranje kompaktnije polimerne mreže te redukciju pora tipičnih za mikročestice kalcijevog alginata.

Manje vrijednosti eksponenta $n < 0,43$ ukazuje da je difuzija TPC kroz strukturu mikročestice kontrolni mehanizam otpuštanja (Tablica 9.). Najsporije otpuštanje TPC opaženo je kod formulacije mikročestica ALG-KAZ-XGUM. To je u skladu s vrlo niskim stupnjem bubrenja, odnosno najgušćom strukturom. Iako nije uočena statistički značajna razlika S_w u deioniziranoj vodi između formulacija većih mikročestica ALG i ALG-KAZ dodatak kazeina kravljeg mlijeka u formulaciju upućuje na smanjenje poroznosti formulacije, a posljedično i smanjenje količine otpuštenog TPC.

Kod formulacija manjih mikročestica ALG-XGUM izmjeren je pad kumulativnog otpuštanja TPC nakon 60. minute što ukazuje na reverznu difuziju polifenola. Jednako je opaženo u istraživanju (Belščak-Cvitanović i sur., 2016b) kod binarnih formulacija mikročestica.

5.3.2. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u otopinama natrijeva klorida

Manje vrijednosti eksponenta $n < 0,43$ ukazuje da je difuzija TPC kroz strukturu mikročestice kontrolni mehanizam otpuštanja (Tablica 9). (Tablica 10). Utjecaj sastava otopina NaCl na količinu otpuštenog TPC uočena je samo kod većih mikročestica ALG-XGUM koja ujedno bilježi i najveću količinu otpuštenog TPC u otopinama NaCl. Povećanje udjela NaCl u deioniziranoj vodi te hidrofilna svojstva i visok stupanj apsorpcije vode XGUM, uzrokuju značajno visok stupanj bubrenja mikročestica, odnosno manju gustoću mreže gela. Uslijed ionske izmjene kalcijevih kationa (iz strukture kalcijeva alginata) i natrijevih kationa iz otopine NaCl dolazi do raspada

strukture mikročestica (Bajpai i Sharma, 2004; Belalia i Nacer-Eddine, 2016). Zbog najmanje količine otpuštenog TPC u otopinama NaCl, formulacije mikročestica ALG-XGUM-KAZ su najbolje za primjenu u prehrambenim proizvodima koji sadrže NaCl. Moguće objašnjenje spore difuzije TPC iz mikročestica je smanjenje ionske izmjene kalcijevih i natrijevih kationa zbog dodatka kazeina.

5.3.3. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

5.3.3.1. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u otopini klorovodične kiseline

Izlaganjem pripremljenih formulacije mikročestica otopini HCl (pH= 1,58) i pri temperaturi od $37,0 \pm 0,1$, simulirana je probava u želucu čovjeka. Manje vrijednosti eksponenta $n < 0,43$ ukazuje da je difuzija TPC kroz strukturu mikročestice kontrolni mehanizam otpuštanja (Tablica 11). Formulacija mikročestica ALG pokazala se najmanje učinkovitom zbog najveće količine otpuštenog TPC (43,4 %). Razlog je već spomenuta protonizacija kalcijeva alginata, formiranje netopljive alginske kiseline te difuzija kalcijevih kationa u okolni medij (Patel i sur., 2016). Dodatak ksantan gume i/ili kazeina kravljeg mlijeka u formulaciju, pokazao se učinkovitim te su frakcije otpuštanja TPC iznosila od 20,7 do 33,5 %. Tropolimernom kombinacijom (ALG-KAZ-XGUM) ojačana je struktura mikročestica, a samim time i reducirana erozija. Slični rezultati opaženi su u istraživanju Nikoo i sur. (2018) dodatkom kitozana u formulaciju te u istraživanju (Hajaratul i sur., 2020) dodatkom inulina. Na mikroskopskim fotografijama (Slika 26. do Slika 29.) nisu opaženi raspadi mikročestica te dodatak biopolimera u formulaciju mikročestica pokazuje potencijal u sprječavanju neželjenog otpuštanja inkapsuliranih polifenola u želucu.

5.3.3.2. In vitro otpuštanje ukupnog sadržaja polifenola iz mikročestica u fosfatnom puferu

Disperzijom formulacija mikročestica različitih veličina u fosfatnom puferu (pH = $7,4 \pm 0,01$) i pri temperaturi od $37,0 \pm 0,1$, simulirana je intestinalna probava čovjeka. Manje vrijednosti eksponenta $n < 0,43$ ukazuje da je difuzija TPC kroz strukturu mikročestice kontrolni mehanizam otpuštanja (Tablica 12). Statistički značajne razliku u otpuštanjima TPC između manjih i većih mikročestica detektirane su samo kod formulacije mikročestica ALG-XGUM-KAZ uz brži raspad većih mikročestica i 100 % otpuštanje TPC već u 50. minuti nakon čega je uslijedio 5 % rast. Mikročestice veličine 750 μm postigle su 100 % kumulativno otpuštanje tek u 120. minuti.

Izlaganje svih formulacija mikročestica intestinalnim uvjetima rezultiralo je njihovom degradacijom i potpunim otpuštanjem TPC što je potvrđeno i mikroskopskim fotografijama (Slika 32. do Slika 35.), a i u skladu je s literaturnim podacima (Pongjanyakul i Puttipipatkachorn, 2007; He i sur., 2015; Patel i sur., 2016; Bušić i sur., 2018; Hajaratul i sur., 2020). Dispergiranjem mikročestica u fosfatnom puferu zbiva se ionska izmjena između natrijevih kationa (iz smjese 0,2 M Na_2HPO_4 i 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) i kalcijevih kationa (iz kalcijeva alginata) uz nastajanje kalcijeva fosfata. Posljedično, relaksira se polimerna mreža te dolazi do visokog stupnja bubrenja i u konačnici erozije te raspada mikročestica (Bajpai i Sharma, 2004). Dodatkom XGUM u formulaciju ostvareno je željeno postepeno otpuštanje u intestinalnim uvjetima zbog redukcije erozije mikročestica i poroznosti karakteristične za natrijev alginat. Jednako je utvrđeno u istraživanju (Pongjanyakul i Puttipipatkachorn, 2007).

6. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakcija (potpomognuta ultrazvukom) ukupnih polifenola praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni, korištenjem vode kao ekstrakcijskog otapala, pokazala se učinkovitom i ekološki prihvatljivom metodom zbog visokih ekstrakcijskih prinosa postignutim u kratkom vremenu.
2. Optimalni uvjeti za ultrazvučnu ekstrakciju ukupnih polifenola praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni su: koncentracija 6 g/L, amplituda 75 te vrijeme ekstrakcije od 9 minuta.
3. Mikrosfere pripravljene metodom ionskog geliranja, upotrebom natrijeva alginata, kazeina kravljeg mlijeka i ksantan gume te ispunjene s biološki aktivnim sastojkom (polifenoli ekstrahirani iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni ultrazvučnom ekstrakcijom) stabilne su i pokazuju potencijal primjene u prehrani ljudi.
4. Dodatkom biopolimera u formulaciju mikrosfera, postižu se veća efikasnost i kapacitet inkapsulacije zbog redukcije poroznosti natrijeva alginata. Najveću efikasnost i kapacitet inkapsulacije u mikrosferama postignuti su korištenjem smjese biopolimera ALG-XGUM-KAZ uz statistički beznačajnu razliku o veličini.
5. Stupanj bubrenja mikročestica ovisi o sastavu njihova nosača te sastavu otopine u kojoj su dispergirane. Dodatkom XGUM u formulaciju mikročestica izmjereni su najviši stupnjevi bubrenja u deioniziranoj vodi, otopini HCl te otopinama NaCl zbog izrazite hidrofilnosti i visokog stupnja apsorpcije vode.
6. Sušenje mikrosfera rezultiralo je smanjenjem veličina i promjenom morfoloških karakteristika uslijed relaksacije polimernih lanaca.
7. Veličine mikročestica te njihova veličina nakon bubrenja u deioniziranoj vodi, otopini HCl i otopinama NaCl ovise o sastavu nosača. Dodatkom biopolimera povećava se promjer mikročestica kao i njihovi promjeri nakon bubrenja u deioniziranoj vodi, otopini HCl i otopinama NaCl raznih koncentracija. Najveće promjene izmjerene su uz dodatak XGUM.
8. Odabir biopolimera nosača na *in vitro* otpuštanje ukupnih polifenola iz mikročestica u deioniziranoj vodi važan je podatak zbog njihove primjene u prehrambenim proizvodima visokog sadržaja vode. Dodatkom biopolimera u formulaciju, postiže se željeno smanjenje

otpuštanja ukupnih polifenola. Najniža frakcija otpuštenog TPC u deioniziranoj vodi ostvarena je primjenom formulacije mikročestica ALG-KAZ zbog niskog stupnja bubrenja, odnosno najgušće trodimenzionalne strukture gela.

9. Odabir biopolimera nosača na otpuštanje ukupnih polifenola iz mikročestica u otopinama NaCl važan je podatak zbog primjene mikročestica u prehrambenim proizvodima koje sadrže NaCl. Dodatkom biopolimera u formulaciju smanjuje se otpuštanje TPC. Najučinkovitija je formulacija ALF-XGUM-KAZ je zbog vrlo niskog otpuštanja TPC u otopinama NaCl.
10. U simuliranim gastro uvjetima, dodatkom ksantan gume i/ili kazeina kravljeg mlijeka u formulaciju postiže se željeno nisko otpuštanje TPC i sprječava se degradacija mikročestica.
11. Izlaganje istraživanih formulacija mikročestica u simuliranim intestinalnim uvjetima rezultiralo je njihovom degradacijom i potpunim otpuštanjem ukupnih polifenola. Postepeno željeno otpuštanje ostvareno je dodatkom ksantan gume.

7. ZAHVALE

Prvenstveno se zahvaljujem mojim mentorima, dr. sc. Slavenu Juriću i izv. prof. dr. sc. Marku Vincekoviću, na ukazanoj prilici i povjerenju, strpljenju, stručnom vodstvu i nesebično izdvojenom vremenu. Hvala vam na poticanju moje želje za učenjem i uključivanjem u znanstveno – istraživački rad.

Veliko hvala asistentima dr. sc. Kristini Vlahoviček – Kahlini i dr. sc. Marijanu Marijanu na svom prenesenom znanju, velikoj podršci i pomoći u svakom koraku izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda za kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi, otvorenosti i brojnim savjetima.

Posebno se zahvaljujem mojoj mami, sestri, Jeleni Galić i Sanji Maturanec na strpljenju, ohrabrivanju i što su, kao i uvijek, moja najveća podrška.

8. POPIS LITERATURE

1. Abdel-Moneim A. E., Shehata A. M., Alzahrani S. O., Shafi M. E., Mesalam N. M., Taha A. E., Swelum A.A., Arif M., Fayyaz M., Abd El-Hack M. E. (2020). The role of polyphenols in poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpn.13455> - pristup: 10.02.2021.
2. Abugabr Elhag H. E. E., Naila A., Nour A. H., Ajit A., Sulaiman A. Z., Aziz B. A. (2018). Optimization of protein yields by ultrasound assisted extraction from *Eurycoma longifolia* of agitation speed. *Journal of King Saud University - Science*. 31 (4): 913-930.
3. Adebooye O. C., Alashi A. M., Aluko R. E. (2018). A brief review on emerging trends in global polyphenol research. *Journal of Food Biochemistry*. 42(4): e12519.
4. Ahmed E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*. 6(2): 105–121.
5. Ameer K., Shahbaz H. M., Kwon J. H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16(2): 295–315.
6. Bajpai S. K., Sharma S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *Reactive and Functional Polymers*. 59(2): 129–140.
7. Belalia F., Djelali N.E. (2016). INVESTIGATION OF SWELLING/ADSORPTION BEHAVIOR OF CALCIUM ALGINATE BEADS. *Revue Roumaine de Chimie*. 61: 747-754.
8. 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.
9. Belščak-Cvitanović A., Bušić A., Barišić L., Vrsaljko D., Karlović S., Špoljarić I., Vojvodić A., Mršić G., Komes D. (2016a). Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids*. 57:139–152.

10. Belščak-Cvitanović A., Jurić S., Đorđević V., Barišić L., Komes D., Ježek D., Bugarski B., Nedović V. (2016b). Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. *International Journal of Food Properties*. 20(9): 1971–1986.
11. Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V., Komes D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*. Woodhead Publishing. 3-44.
12. Bhat M. Y., Dar T. A., Singh L. R. (2016). Casein Proteins: Structural and Functional Aspects. *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. <https://www.intechopen.com/books/milk-proteins-from-structure-to-biological-properties-and-health-aspects/casein-proteins-structural-and-functional-aspects> – pristup: 25.01.2021.
13. Blandón L. M., Islan G. A., Castro G. R., Nosedá M. D., Thomaz-Soccol V., Soccol C. R. (2016). Kefiran-alginate gel microspheres for oral delivery of ciprofloxacin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 145: 706–715.
14. 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.
15. Bušić A., Belščak-Cvitanović A., Vojvodić Cebin A., Karlović S., Kovač V., Špoljarić I., Mršić G., Komes D. (2018). Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Research International*. 111: 244–255.
16. Cano-Barrita P. F. de J., León-Martínez F. M. (2016). Biopolymers with viscosity-enhancing properties for concrete. *Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials*. Woodhead Publishing. 221–252.
17. Carbonell-Capella J. M., Šic Žlabur J., Rimac Brnčić S., Barba F. J., Grimi N., Koubaa M., Brnčić M., Vorobiev E. (2017). Electrotechnologies, microwaves, and ultrasounds combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(5), e13179.

18. Chemat F., Vian M. A., Cravotto G. (2012). Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(7): 8615–8627.
19. Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 540–560.
20. Ching S. H., Bansal N., Bhandari B. (2015). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(6): 1133–1152.
21. Chong J., Poutaraud A., Huguency P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*. 177: 143-155.
22. Ciulu M., Quirantes-Piné R., Spano N., Sanna G., Borrás-Linares I., Segura-Carretero A. (2017). Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from *Salvia rebaudiana* Bertoni leaves. *Industrial Crops and Products*. 108: 106–112.
23. Cordova F. M., Watson R. R. (2014). Food and Supplement Polyphenol Action in Cancer Recurrence. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Academic Press. 191–195.
24. Cvejić Hogervorst J., Russo G., Godos J., Mimica-Dukić N., Simin N., Bjelica A., Grosso G. (2018). Beneficial effects of polyphenols on chronic diseases and ageing. *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*. Woodhead Publishing. 69–102.
25. Dent M., Dragović-Uzelac V., Elez Garufolić I., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M. (2015). Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 29(3): 475–484.
26. Desai K. G. H., Jin Park H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 23(7): 1361–1394.
27. Dhir A. (2020). Natural polyphenols in preclinical models of epilepsy. *Phytotherapy Research*. Wiley. 1–14.
28. Dobrinčić A., Repajić M., Garofulić I. E., Tuđen L., Dragović-Uzelac V., Levaj B. (2020). Comparison of Different Extraction Methods for the Recovery of Olive Leaves

- Polyphenols. *Processes*. 8(9): 1008. <https://www.mdpi.com/2227-9717/8/9/1008> - pristup: 17.02.2021.
29. Doo T., Maskarinec G. (2014). Polyphenols and Breast Cancer Prevention. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Academic Press. 1331–1340.
 30. Doppalapudi S., Katiyar S., Domb A. J., Khan W. (2014). Biodegradable Natural Polymers. *Advanced Polymers in Medicine*. 33–66.
 31. Drmić H., Režek Jambrak A. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology*. 2(2): 22-33.
 32. Estevinho B. N., Rocha F. (2018). Application of Biopolymers in Microencapsulation Processes. *Biopolymers for Food Design*. Elsevier. 191–222.
 33. Flórez N., Conde E., Domínguez H. (2014). Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 90(4): 590–607.
 34. Fuss E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochemistry Reviews*. 2: 307–320.
 35. Gadeyne F., De Neve N., Vlaeminck B., Fievez V. (2017). State of the art in rumen lipid protection technologies and emerging interfacial protein cross-linking methods. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 119:1600345. <http://hdl.handle.net/1854/LU-8522585> - pristup: 5.02.2021.
 36. Galili S., Hovav R. (2014). Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds. *Polyphenols in Plants*. 305–323.
 37. Gessner D. K., Ringseis R., Eder K. (2016). Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(4): 605–628.
 38. Giri K., Thakur T., Tripathi D. (2016). Biodegradable Hydrogel Bead of Casein and Modified Xanthan Gum for Controlled Delivery of Theophylline. *Current Drug Therapy*. 11(2): 150–162.
 39. Głąb T. K., Boratyński J. (2017). Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents. *Topics in Current Chemistry*. 375(4): 71-91.
 40. 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): 1–12.

41. Hajaratul N.M., Solehah N.N. (2020). Journal of Physics: Conference series. 1532 012013. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1532/1/012013> - pristup: 1.05.2021.
42. Han X., Shen T., Lou H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. International Journal of Molecular Sciences. 8(9): 950–988.
43. He Z., Zhang X., Qi W., Huang R., Su R. (2015). Alginate-casein microspheres as bioactive vehicles for nutrients. Transactions of Tianjin University. 21(5), 383–391.
44. Jabeen M., Begum S., Siddique A., Fatima S. S. (2017). Microencapsulation : A potential and promising approach in drug delivery system. Journal of Inventions in Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 1(1): 11-18.
45. Jithendra T., Reddy O.S., Subha M.C.S., Madhavi C., Rao K.C. (2020). Xanthan gum graft copolymer/sodium alginate micro beads coated with chitosan for controlled release of chlorthalidone drug. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 11(3): 1132-1145.
46. Jurić S., Nutrizio M. (2014). Potencijal sekundarnih biljnih sirovina kao izvora funkcionalnih sastojaka prehrambenih proizvoda. Rad za Rektorovu nagradu.
47. Jurić S., Šegota S., Vinceković M. (2019) Influence of surface morphology and structure of alginate microparticles on the bioactive agents release behavior. Carbohydrate Polymers. 218: 234-242.
48. Jurić S., Jurić M., Siddique M. A. B, Fathi M. (2020a) Vegetable oils rich in polyunsaturated fatty acids: Nanoencapsulation methods and stability enhancement. Food Reviews International. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2020.1717524> - pristup: 5.02.2021.
49. Jurić S., Tanuwidjaja I., Fuka M. M., Kahlina K. V., Marijan M., Boras A., Kolić Udiković N., Vinceković M. (2020b). ENCAPSULATION OF TWO FERMENTATION AGENTS, LACTOBACILLUS SAKEI AND CALCIUM IONS IN MICROSPHERES. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 111387. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33049659/> - pristup:17.02.2021
50. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. International Journal of Pharmaceutics. 15: 25–35.

51. Kulkarni V. S., Shaw C. (2016). Use of Polymers and Thickeners in Semisolid and Liquid Formulations. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*. Academic Press. 43–69.
52. Kumar K., Srivastav S., Sharanagat V. S. (2020). Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Bioactive Compounds from Fruit and Vegetable Processing By-Products: A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 105325. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32920300/> pristup: 5.02.2021.
53. Lee Y. K., Chang Y. H. (2020). Microencapsulation of a maca leaf polyphenol extract in mixture of maltodextrin and neutral polysaccharides extracted from maca roots. *International Journal of Biological Macromolecules*. 150: 546-558.
54. Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K. (2012). Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*. 132(3): 1121–1132.
55. Leyva-Gómez G., Piñón-Segundo E., Mendoza-Muñoz N., Zambrano-Zaragoza M., Mendoza-Elvira S., Quintanar-Guerrero D. (2018). Approaches in Polymeric Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery: A Review of the State of the Art. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(6): 1549.
56. Loureiro dos Santos L. A. (2017). Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier. 1-6.
57. Lutfi Z., Alam F., Nawab A., Haq A., Hasnain A. (2019). Effect of NaCl on physicochemical properties of xanthan gum – Water chestnut starch complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 131: 557 – 563.
58. Maiti S., Ray S., Sa B. (2009). Controlled delivery of bovine serum albumin from carboxymethyl xanthan microparticles. *Pharmaceutical Development and Technology*. 14(2): 165–172.
59. Maiti S., Kumari L. (2016). Smart Nanopolysaccharides for the Delivery of Bioactives. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*. Elsevier. 67–94.
60. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5): 727–747.

61. Martínez V., Mitjans M., Vinardell M. P. (2014). Cytoprotective Effects of Polyphenols against Oxidative Damage. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Academic Press. 275–288.
62. Massounga Bora A. F., Ma S., Li X., Liu L. (2018). Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances. *Food Research International*. 105: 241–249.
63. Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., Sánchez-Contreras A., Pacheco N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*. 7(3): 47. <https://www.mdpi.com/2073-4395/7/3/47> - pristup: 16.02.2021.
64. Namdeo S. (2014). Natural Polymers in Drug Delivery Development. *Journal of Microencapsulation*. 6: 54-57.
65. Newmark Milligan L. (2018). Milk Casein Proteins: Ancient, Diverse, and Essential. The International Milk Genomics Consortium. <https://milkgenomics.org/article/milk-casein-proteins-ancient-diverse-essential/> - pristup: 25.01.2021.
66. Nikoo A. M., Kadkhodae R., Ghorani B., Razzaq H., Tucker N. (2018). Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*. 116: 208–216.
67. Norudin N. S., Mohamed H. N., Yahya N. A. M. (2018). Controlled released alginate-inulin hydrogel: Development and in-vitro characterization. *AIP Conference Proceedings*. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.5055515> - pristup:11.03.2021.
68. Nowak R., Olech M., Nowacka N. (2014). Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Academic Press. 1289–1307.
69. Nunes M. A., Rodrigues F., Vinha A. F., Alves R. C., Oliveira M. B. P. P. (2018). Nutrigenomics and polyphenols. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing. 103–132.
70. Orešković M. (2020). Ekološki prihvatljivo suzbijanje kukaca primjenom biorazgradivih mikrosfera na bazi apitoksina. Rad za Rektorovu nagradu.
71. Palaniraj A., Jayaraman V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*. 106(1): 1–12.

72. Patel N., Lalwani D., Gollmer S., Injeti E., Sari Y., Nesamony J. (2016). Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. *Progress in Biomaterials*. 5(2): 117–133.
73. Patil J., Kamalapur M., Marapur S., Kadam D. (2010). Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 5(1): 241-248.
74. Periche A., Castelló M. L., Heredia A., Escriche I. (2015). Influence of Extraction Methods on the Yield of Steviol Glycosides and Antioxidants in *Stevia rebaudiana* Extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*. 70(2): 119–127.
75. Pongjanyakul T., Puttipipatkachorn S. (2007). Xanthan–alginate composite gel beads: Molecular interaction and in vitro characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 331(1): 61–71.
76. Racovită Ș., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009). Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*. 54(9): 709–718.
77. Rajha H.N., Koubaa M., Boussetta N., Maroun G.R., Louka N., Lebovka N., Vorobiev E. (2020). Selective ultrasound-assisted aqueous roots and effect extraction of polyphenols from pomegranate peels and seeds. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.14545> - pristup:17.02.2021.
78. Rastogi V., Samyn P. (2015). Bio-Based Coatings for Paper Applications. *Coatings*. 5(4): 887–930.
79. Reddy O. S., Subha M., Jithendra T., Madhavi C., Rao K. C. (2020). Fabrication and characterization of smart karaya gum/sodium alginate semi-IPN microbeads for controlled release of D-penicillamine drug. *Polymers and Polymer Composites*. 096739112090447. <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0967391120904477?journalCode=ppca> - pristup:18.02.2021.
80. Ribeiro A. M., Estevinho B. N., Rocha F. (2019). Microencapsulation of polyphenols - the specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review. *Trends in Food Science & Technology*.

81. Rodrigo R., Gil-Becerra D. (2014). Implications of Polyphenols on Endogenous Antioxidant Defense Systems in Human Diseases. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 201–217.
82. Roger S., Talbot D., Bee A. (2006). Preparation and effect of Ca^{2+} on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 305: 221–227.
83. Salehi B., López M. D., Martínez-López S., Victoriano M., Sharifi-Rad J., Martorell M., Rodrigues F. C., Martins N. (2019). Stevia rebaudiana Bertoni bioactive effects: From in vivo to clinical trials towards future therapeutic approaches. *Phytotherapy Research*. 33: 2904–2917.
84. Saruchi S.S., Kaith B.S., Kaur M., Sharma N., Kumar V. (2020). Cross-linked xanthan gum–starch hydrogels as promising materials for controlled drug delivery. *Cellulose*. 27: 4565–4589.
85. Schieber M., Chandel N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*. 24(10): 453–462.
86. Segale L., Giovannelli L., Mannina P., Pattarino F. (2016). Calcium Alginate and Calcium Alginate Chitosan Beads Containing Celecoxib Solubilized in a Self-Emulsifying Phase. *Scientifica (Cairo)*. 1–8.
87. Shankar S., Rhim J. W. (2018). Bionanocomposite Films for Food Packaging Applications. *Reference Module in Food Science*. Elsevier. 1-10.
88. Sharpe L. A., Daily A. M., Horava S. D., Peppas N. A. (2014). Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 11(6): 901–915.
89. Siepmann J., Siepmann F. (2013). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 453: 12–24.
90. Sindhi V., Gupta V., Sharma K., Bhatnagar S., Kumari R., Dhaka N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*. 7(9): 828–835.
91. Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
92. Sobel R., Versic R., Gaonkar A. G. (2014). Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. *Microencapsulation in the Food Industry*. Elsevier, San Diego. 3–12.

93. Stalikas C. D. (2010). Phenolic acids and flavonoids: Occurrence and analytical methods. *Methods in Molecular Biology*. 610: 65-90.
94. Sworn G. (2009). Xanthan gum. *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. 15: 325-342
95. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Brnčić M., Dujmić F., Karlović S. (2012). Possibilities of Using High Intensity Ultrasound Technology with Stevia – a Review. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 7 (3-4): 152-158.
96. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Ježek D., Bosiljkov T., Brnčić M. (2013). Stevia rebaudiana Bertoni - A Review of Nutritional and Biochemical Properties of Natural Sweetener. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 78: 25-30.
97. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Brnčić M., Dujmić F., Rimac Brnčić S. (2015). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Functional Ingredients from Stevia Rebaudiana Bertoni Leaves. *International Agrophysics*. 29(2): 231–23.
98. Teixeira da Silva P., Martins Fries L. L., Ragagnin de Menezes C., Tasch Holkem A., Schwan C. L., Wigmann É. F., De Oliveira Bastos J., De Bona da Silva C. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*. 44(7): 1304–1311.
99. Tiwari B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 71: 100–109.
100. Usmiati S., Richana N., Mangunwidjaja D., Noor E., Prangdimurti E. (2014). The Using of Ionic Gelation Method Based on Polysaccharides for Encapsulating the Macromolecules– A Review. *International Conference on Food Security and Nutrition*. 67: 79-84.
101. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1): 44–84.
102. Vasisht N. (2014). Factors and Mechanisms in Microencapsulation. *Microencapsulation in the Food Industry*. Elsevier. San Diego. 15–24.
103. Vergara-Salinas J. R., Pérez-Jiménez J., Torres J. L., Agosin E., Pérez-Correa J. R. (2012). Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant

- Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(44): 10920–10929.
104. Vinceković M., Jalšenjak N., Topolovec-Pintarić S., Đermić E., Bujan M., Jurić S. (2016). Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64: 8073–8083.
 105. Vinceković M., Jurić S., Đermić E., Topolovec-Pintarić S. (2017). Kinetics and Mechanisms of Chemical and Biological Agents Release from Biopolymeric Microcapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65: 9608–9617.
 106. Vinceković M., Vlahoviček Kahlina K., Jurić S. (2019). Trends in Agricultural Production: Microencapsulation. *Novel Techniques in Nutrition and Food Science*. 4(2): 324-325.
 107. Vladislavljević G. T. (2012). Encapsulation application. U: *Encyclopedia of membranes*. Springer. ID: 313643. Heidelberg.
 108. Wang Z., Hu S., Wang H. (2017). Scale-Up Preparation and Characterization of Collagen/Sodium Alginate Blend Films. *Journal of Food Quality*. 1–10.
 109. Web of Science. <https://webofknowledge.com/> - pristup 30.01.2021.
 110. Yan Z., Xie L., Tian Y., Li M., Ni J., Zhang Y., Niu L. (2020). Insights into the Phytochemical Composition and Bioactivities of Seeds from Wild Peony Species. *Plants*. 9(6): 729.
 111. Yildiz-Ozturk E., Nalbantsoy A., Tag O., Yesil-Celiktas O. (2015). A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxide inhibition activities. *Industrial Crops and Products*. 77: 961–971.
 112. Yılmaz F. M., Görgüç A., Uygun Ö., Bircan C. (2020). Steviol glycosides and polyphenols extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves using maceration, microwave-, and ultrasound-assisted techniques. *Separation Science and Technology*. 1–13.
 113. Zaidan U., Hamid S. N. M., Yusof M. F. M., Ahmad S., Gani S. S. A., Shamsi S. (2018). Chemical evaluation and antioxidant properties of extracts and essential oil from *Stevia rebaudiana* leaves. *Malaysian Applied Biology*. 47: 15-23.

114. Živković I. P., Jurić S., Vinceković M., Galešić M. A., Marijan M., Vlahoviček-Kahlina K., Mikac K.M., Lemić D. (2020). Polyphenol-Based Microencapsulated Extracts as Novel Green Insecticides for Sustainable Management of Polyphagous Brown Marmorated Stink Bug (*Halyomorpha halys* Stål, 1855). *Sustainability*. 2(23): 10079. <https://www.mdpi.com/2071-1050/12/23/10079> pristup: 16.02.2021.

9. SAŽETAK

Sara Kolar

Inkapsulacija i otpuštanje prirodnih polifenolnih spojeva iz multikomponentnih mikročestica hidrogelova

Proizvodnja funkcionalne hrane s bioaktivnim spojevima neprestano se povećava zbog velikog interesa za upotrebu prirodnih resursa u prehrani i prevenciji bolesti. Veliki je interes za ekstrakciju sekundarnih biljnih metabolita, posebno polifenola, i njihovu implementaciju u prehrambene proizvode. Vrlo bogat izvor polifenola je biljka *Stevia Rebaudiana* Bertoni s visokim sadržajem polifenola u lišću. Većina proizvođača prirodnih zaslađivača i dalje ostavlja velike količine polifenola u čvrstom otpadu pa je izdvajanje polifenola iz lišća stevije inovativan i vrijedan izvor ovih bioaktivnih tvari. Uz odgovarajuće uvjete ekstrakcije, učinkovitost polifenola ovisi o održavanju njihove stabilnosti, bioaktivnosti i bioraspoloživosti. Polifenoli su vrlo osjetljivi spojevi koji su podložni razgradnji, a inkapsulacija u multikomponentne mikročestice hidrogela napredna je tehnologija koja ih štiti od vanjskih utjecaja. Cilj ovog rada bio je istražiti optimalne uvjete ekstrakcije ukupnih polifenola iz praha lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni, inkapsulirati ekstrakt u multikomponentne mikročestice hidrogelova i pripremiti optimalne formulacije mikročestica za potencijalnu primjenu u agro-prehrambenoj industriji.

Ultrazvučna ekstrakcija ukupnih polifenola lišća biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni (TPC), upotrebom vode kao otapala za ekstrakciju, pokazala se učinkovitom i ekološki prihvatljivom metodom zbog visokih ekstrakcijskih prinosa postignutih u kratkom vremenu. TPC ekstrakti su inkapsulirani metodom ionskog geliranja u mikročestice biopolimera alginata, alginata i kazeina kravljeg mlijeka te smjese alginata, kazeina kravljeg mlijeka i ksantan gume. Morfološka svojstva, veličina čestica, učinkovitost i kapacitet inkapsulacije, kao i bubrenje, kinetika i mehanizam oslobađanja TPC u deioniziranoj vodi, otopinama NaCl i u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima istraženi su iz pripremljenih formulacija mikročestica.

Rezultati su pokazali da je dodatak kazeina ili ksantan gume promijenio opseg umrežavanja u gelu kalcijevog alginata, ali nije utjecao na kontrolni mehanizam oslobađanja TPC definiran kao Fickova difuzija. Ovisno o kinetici i količini oslobođenog TPC-a, formulacije alginatnih

mikročestica ne preporučuju se za primjenu u prehrambenim proizvodima s visokim udjelom vode. Formulacija mikročestica alginat - ksantan guma - kazein najbolja je za primjenu u prehrambenim proizvodima koji sadrže NaCl, dok se dodavanjem ksantan gume i / ili kazeina postiže željeno nisko oslobađanje TPC i sprječava razgradnja mikročestica u simuliranim gastro uvjetima. U simuliranim intestinalnim uvjetima svi se pripravci mikročestica raspadaju i potpuno oslobađaju TPC. Postupno željeno oslobađanje postignuto je dodavanjem ksantan gume.

Ključne riječi: ultrazvučna ekstrakcija; polifenoli; *Stevia Rebaudiana* Bertoni; inkapsulacija; mikročestice hidrogelova

10. SUMMARY

Sara Kolar

Encapsulation and release of natural polyphenolic compounds from multi-component hydrogel microparticles

The production of functional foods with bioactive compounds is constantly increasing due to the great interest in the use of natural resources in nutrition and disease prevention. There is great interest in the extraction of secondary plant metabolites, especially polyphenols, and their implementation in food products. A very rich source of polyphenols is the plant *Stevia Rebaudiana* Bertoni with a high content of polyphenols in the leaves. Most manufacturers of natural sweeteners still leave large amounts of polyphenols in Stevia solid waste, so the extraction of polyphenols from Stevia leaves is an innovative and valuable source of these bioactive substances. With appropriate extraction conditions, the effectiveness of polyphenols depends on maintaining their stability, bioactivity, and bioavailability. Polyphenols are very sensitive compounds subject to degradation, and encapsulation in multi-component hydrogel microparticles is an advanced technology that protects them from external influences. The aim of this study was to investigate the optimal conditions for extraction of polyphenols from *Stevia Rebaudiana* Bertoni leaves powder, to encapsulate the extract in multi-component hydrogel microparticles and to prepare optimal microparticle formulations for potential application in the agri-food industry.

Ultrasonic extraction of total leaf polyphenols by *Stevia Rebaudiana* Bertoni (TPC), using water as the extraction solvent, has proven to be an efficient and environmentally friendly method due to the high extraction yields achieved in a short time. TPC extracts were encapsulated by ionic gelling in microparticles of alginate biopolymers or mixtures of alginate, casein and xanthan gum. Morphological properties, particle size, efficiency and encapsulation capacity, as well as swelling, kinetics and mechanism of TPC released in deionized water, NaCl solutions and in simulated gastrointestinal conditions were investigated from prepared microparticle formulations.

The results revealed that the addition of casein or xanthan gum altered the extent of crosslinking in the calcium alginate gel, but did not affect the control mechanism of TPC release defined as Fickian diffusion. Depending on the kinetics and amount of TPC released, the alginate microparticle formulations are not recommended for implementation in food products with high water content. The alginate-xanthan gum-casein microparticle formulation is the best for implementation in food products containing NaCl, while the addition of xanthan gum and/or casein achieves the desired low TPC release and prevents microparticle degradation under simulated gastro conditions. Under simulated intestinal conditions, all microparticle formulations decomposed and completely released TPC. The gradual desired release was achieved by the addition of xanthan gum.

Keywords: ultrasound assisted extraction; polyphenols; *Stevia Rebaudiana* Bertoni; encapsulation; hydrogel microparticles

ŽIVOTOPIS AUTORA

Sara Kolar rođena je 6. studenog 1993. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u Klanjcu, a opću gimnaziju u Zagrebu. Nakon uspješno položenih međunarodnih ispita TOEFL iBT i SAT (Chemistry and Biology M), akademske godine 2015./2016. upisuje studij medicine na engleskom jeziku na Lithuanian University of Health Science (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) u Litvi. Akademske godine 2017./2018. upisuje preddiplomski studij Animalnih znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U rujnu 2020. godine završava preddiplomski studij obranom završnog rada na temu „Primjena mikroinkapsulacije u hrani za životinje“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marka Vincekovića te je stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke animalnih znanosti. Po završetku preddiplomskog studija, Agronomski fakultet dodjeljuje joj Nagradu za marljivost i ostvarenje uzornih rezultata u studiranju s prosjekom 4,79. Iste godine, dobitnica je stipendije za izvrsnost Zaklade Agronomskog fakulteta, predstavlja Agronomski fakultet na Smotri Sveučilišta te upisuje diplomski studij Genetike i oplemenjivanja životinja. Od druge godine preddiplomskog studija demonstratorica je na laboratorijskim vježbama kolegija Kemija s osnovama biokemija i Agrikulturna kemija, student tutor te ispomoć na upisima studentskoj referadi. U govoru i pismu, fluentno se koristi engleskim te ruskim jezikom kojeg usavršava 2017. godine na Petrozavodsk State University u Ruskoj Federaciji. Područja njezinog interesa su ekstrakcija i inkapsulacija bioaktivnih sastojaka, hranjivost voluminozne krme i stočne hrane u hranidbi životinja, biometrika te statistička obrada u računalnim programima SAS i RStudio. Aktivno piše znanstvene i stručne radove od čega je 1 na postupku recenzije, a 2 u pripremi za slanje u časopis.