

Kinetika otpuštanja fenolnih spojeva iz liofilizacijom inkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa sorte cabernet sauvignon

Nemet, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:567684>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Anja Nemet

**KINETIKA OTPUŠTANJA FENOLNIH SPOJEVA IZ LIOFILIZACIJOM
INKASPULIRANIH EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA SORTE CABERNET
SAUVIGNON**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za Prehrambeno inženjerstvo
Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Jedinične operacije u prehrambenom inženjerstvu

Tema rada je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 18. srpnja 2022.

Mentor: prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

Pomoć pri izradi: Josipa Martinović, mag. ing.

Kinetika otpuštanja fenolnih spojeva iz liofilizacijom inkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa sorte cabernet sauvignon

Anja Nemet, 0113141975

Sažetak:

U radu je ispitan utjecaj različitih omotača na *in vitro* otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz inkapsuliranog tropa grožđa sorte cabernet sauvignon. Inkapsulacija je provedena metodom liofilizacije primjenom omotača prirodnog porijekla: natrij alginat, natrij alginat i maltodekstrin (DE 16,5-19,5), natrij alginat i guma arabika te natrij alginat i guma tragacanth. *In vitro* otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva provedeno je u tri faze koje oponašaju probavni sustav: oralna, želučana i crijevna faza. Najveće otpuštanje fenolnih spojeva dobiveno je u želučanoj fazi korištenjem natrij alginata (61,96 mg_{UF}/g_{UZ}) kao omotača. Primjenom natrij alginata sa gumom arabikom i sa gumom tragacanth najveće otpuštanje fenolnih spojeva odvijalo se u crijevnoj fazi u vrijednostima 53,90 te 59,98 mg_{UF}/g_{UZ}. Ispitane su i antioksidacijske aktivnosti nakon svake faze pomoću dvije metode ABTS i FRAP. Usporedbom rezultata, najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene su na kraju želučane faze za svaki uzorak. Nadalje, kinetika otpuštanja fenolnih spojeva opisana je korištenjem matematičkih modela. Modelom prvog reda opisano je otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsulata gdje su omotači bili natrij alginat te kombinacija natrij alginata sa maltodekstrinom, dok je kinetika otpuštanja opisana Korsmeyer-Peppas modelom za preostala dva uzorka.

Ovaj diplomski rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost "Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227).

Ključne riječi: trop grožđa, fenolni spojevi, inkapsulacija, liofilizacija, *in vitro* otpuštanje

Rad sadrži: 50 stranica
9 slika
5 tablica
108 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Mirela Planinić | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. Marina Tišma | član |
| 4. prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić | zamjena člana |

Datum obrane: 7. srpnja 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of Food Engineering

Sub-department of Mechanical, Thermal and Separation Processes

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Course title: Unit Operations In Food Engineering

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X held on July 18, 2022.

Mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, prof.

Technical assistance: Josipa Martinović, mag. ing.

Release Kinetics of Phenolic Compounds from Encapsulated Extracts of Cabernet Sauvignon Grape Pomace by Freeze-Drying

Anja Nemet, 0113141975

Summary:

In this work the influence of different coatings on the *in vitro* release of total phenolic compounds from the encapsulated grape pomace extract of Cabernet Sauvignon variety was investigated. Encapsulation was performed by the freeze-drying method using a coating of natural origin: sodium alginate, sodium alginate and maltodextrin (DE 16.5-19.5), sodium alginate and gum arabic, and sodium alginate and gum tragacanth. *In vitro* release of total phenolic compounds was performed in three phases mimicking the digestive system: oral, gastric, and intestinal. The highest release of phenolic compounds was obtained in the gastric phase using sodium alginate as a coating (61.96 mg_{UF}/g_{UZ}). When sodium alginate with gum arabic and gum tragacanth was used, the highest release of phenolic compounds occurred in the intestinal phase at 53.90 and 59.98 mg_{UF}/g_{UZ}, respectively. Antioxidant activities were also tested after each phase using both ABTS and FRAP methods. The comparison of the results showed that the highest values of antioxidant activity were obtained at the end of the gastric phase for each sample. Mathematical models were used to describe the release kinetics of the phenolic compounds. The first-order model described the release of phenolic compounds from freeze dried powders in which the coatings used were sodium alginate and a combination of sodium alginate and maltodextrin, while the release kinetics for the combination of sodium alginate with gums were described by the Korsmeyer-Peppas model.

Graduate thesis was supported by the Croatian Science Foundation under the project "Development of a sustainable integrated process for the production of bioactive isolates from food industry residues" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227).

Key words: grape pomace, phenolic compounds, encapsulation, freeze-drying, *in vitro* release

Thesis contains: 50 pages
9 figures
5 tables
108 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Mirela Planinić, PhD, prof. | chair person |
| 2. Ana Bucić-Kojić, PhD, prof. | supervisor |
| 3. Marina Tišma, PhD, prof. | member |
| 4. Daliborka Koceva Komlenić, PhD, prof. | stand-in |

Defense date: July 7, 2023

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić što mi je pružila priliku izrade diplomskog rada, te na izdvojenom vremenu i pomoći pri izradi rada.

Također se zahvaljujem asistentici Josipi Martinović, mag. ing. na strpljenju, poticanju prilikom odrađivanja praktičnog dijela i savjetima pri izradi diplomskog rada.

Posebno hvala mojim dragim roditeljima na podršci tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. FENOLNI SPOJEVI TROPA GROŽĐA	4
2.2. INKAPSULACIJA	6
2.2.1. Maltodekstrini	8
2.2.2. Alginati	9
2.2.3. Guma tragacanth	9
2.2.3. Guma arabika	10
2.2.4. Metoda liofilizacije	10
2.3. OTPUŠTANJE FENOLNIH SPOJEVA	11
2.3.1. <i>In vitro</i> statički model ispitivanja biodostupnosti fenolnih spojeva	13
2.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE OTPUŠTANJA FENOLNIH SPOJEVA	14
2.4.1. Model prvog reda	17
2.4.2. Higuchi model	17
2.4.3. Hixson-Crowell model	18
2.4.4. Korsmeyer-Peppas model	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. ZADATAK	21
3.2. MATERIJALI I METODE	21
3.2.1. Kemikalije	21
3.2.2. Priprema ekstrakta	22
3.2.3. Inkapsulacija metodom liofilizacije	22
3.2.4. <i>In vitro</i> otpuštanje fenolnih spojeva	24
3.3. ANALITIČKE METODE	26
3.3.1. Određivanje ukupnih fenolnih tvari	26
3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom	27
3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	28
3.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. ISPITIVANJE <i>IN VITRO</i> OTPUŠTANJA INKAPSULIRANIH FENOLNIH SPOJEVA	31

4.2. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI TIJEKOM <i>IN VITRO</i> OTPUŠTANJA INKAPSULIRANIH FENOLNIH SPOJEVA.....	33
4.3. KINETIKA OTPUŠTANJA FENOLNIH SPOJEVA.....	34
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Preradom sirovina biljnog porijekla u razne proizvode nastaju velike količine otpada. Iskorištavanje otpada iz prehrambene industrije danas je od velikog interesa zbog ekonomske isplativosti te mogućnosti proizvodnje proizvoda s dodanom vrijednošću (Valiente i sur., 1995). Vinova loza jedna je od najzastupljenijih uzgajanih kultura u svijetu, a i u Hrvatskoj. Tijekom prerade grožđa u vino ili sok nastaje kruti otpad koji se naziva trop. Trop grožđa sastoji se od zaostale kožice bobica grožđa, sjemenki te peteljki (Bordiga i sur., 2019), a izrazito je bogat bioaktivnim komponentama – fenolnim spojevima (Fontana i sur., 2013). Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje kao što je protuupalni, antialergijski i antimikrobni učinak, koji proizlazi iz njihove antioksidacijske aktivnosti. Nadalje, fenolni spojevi izrazito su nestabilni i osjetljivi te je potrebno očuvati njihovu stabilnost (Ajila i sur., 2011). Inkapsulacija je metoda kojom se upotrebom omotača neka aktivna tvar štiti od okoline u kojoj se nalazi te se pokazala kao učinkovita tehnika za očuvanje bioaktivnih svojstava fenolnih spojeva (Grgić i sur., 2020). Prednost inkapsulacije je omogućavanje kontroliranog oslobađanja inkapsuliranih bioaktivnih spojeva te omogućavanje njihove potencijalne apsorpcije u ciljanim dijelovima gastrointestinalnog sustava. S ciljem ispitivanja otpuštanja i stabilnosti bioaktivnih spojeva najčešće se provodi *in vitro* simulacija probave. Ovim načinom oponašaju se procesi koji se odvijaju u ljudskom probavnom sustavu. U razumijevanju mehanizma otpuštanja bioaktivnih komponenti veliku ulogu ima matematičko modeliranje, odnosno matematički modeli koji su se pokazali kao vrlo koristan alat za opisivanje otpuštanja aktivnih tvari do mjesta moguće apsorpcije, odnosno tankog i debelog crijeva (Bruschi, 2015). U ovom radu ispitan je utjecaj primjene različitih omotača prirodnog porijekla na *in vitro* otpuštanje inkapsuliranih fenolnih spojeva iz tropa grožđa te je navedeni proces opisan prikladnim matematičkim modelima.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. FENOLNI SPOJEVI TROPA GROŽĐA

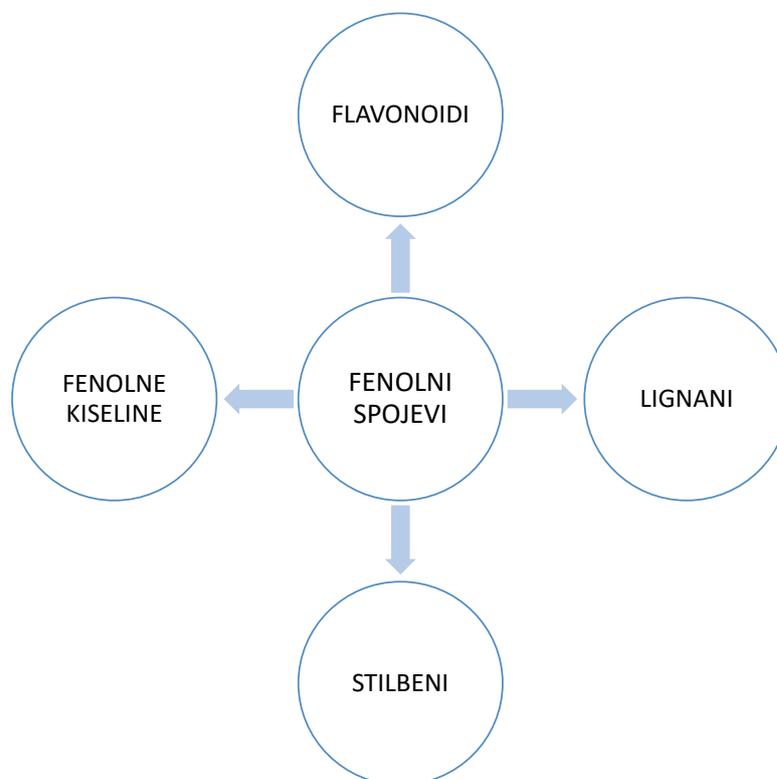
Trop grožđa je kruti nusprodukt koji nastaje nakon prešanja svježeg grožđa u proizvodnji bijelog vina i prešanjem fermentirane komine grožđa u proizvodnji crnog vina i čini cca. 20-25% početne mase grožđa (Spigno i sur., 2017). Danas se u svijetu proizvede otprilike 9 milijuna tona tropa grožđa godišnje (Katalinić i sur., 2010). Trop grožđa je kompleksnog sastava i sastoji se od:

- sjemenki grožđa – obično dvije ili tri po bobici i one čine cca. 25-35% mase svježeg tropa grožđa bez peteljke. Vrlo su bogate antioksidansima primjerice fenolnim spojevima te masnim kiselinama primjerice omega-6 esencijalnom masnom kiselinom - linolnom kiselinom (Unusan, 2020);
- kožice – membrana koja okružuje pulpu i sjemenke, a sastoji se od epiderme od 6-10 slojeva spljoštenih stanica, prekrivenih voštanom tvari zvanom pruina, idealnim supstratom za rast kvasaca i drugih mikroorganizama (Putnik i sur., 2018); a katkada i
- peteljki – uglavnom se sastoje od celuloznih tvari, male količine jednostavnih ugljikohidrata te organskih i mineralnih soli. Peteljka obavlja važne funkcije u transportu svih tvari koje se talože u bobicama i odlikuje se visokim sadržajem tanina (Barros i sur., 2015).

Na kemijski sastav tropa grožđa utječu sorta grožđa, stupanj zrelosti, berba i tehnološki proces vinifikacije (Kammerer i sur., 2004; Arnous i Meyer, 2009). Trop grožđa sastoji se od 42,6-74,5% vlakana, 2,7-49,1% šećera, 7,0-23,5% proteina i 4,8-6,7% ukupnih fenolnih spojeva (Zheng i sur., 2012; Manara i sur., 2014). Zadnjih nekoliko godina sve više istraživanja usmjereno je na potencijalnu upotrebu tropa grožđa u proizvodnji prehrambenih dodataka ili proizvoda s dodanom vrijednošću uglavnom povezanih s činjenicom da je trop grožđa bogat izvor fenolnih spojeva koji imaju protektivni učinak na ljudsko zdravlje zbog antioksidativnog djelovanja (Taladrid i sur., 2023). Procjenjuje se da oko 60-70% fenolnih spojeva grožđa zaostaje u tropu dok samo 30% fenolnih spojeva prijeđe u vino tijekom procesa vinifikacije (Dwyer i sur., 2014).

Fenolni spojevi su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti koji nastaju putem šikiminske kiseline u biljkama tijekom njihova rasta ili kao odgovor na stresne uvjete okoliša kao što su mikrobne infekcije, ozljede ili UV zračenje. Uglavnom se nalaze u voću, povrću,

mahunarkama, čaju, vinu i kavi, a njihov sadržaj u biljci ovisi o sorti, uvjetima uzgoja, dozrijevanju, berbi, kao i o uvjetima prerade i skladištenja (Grgić i sur., 2020). Poznato je da su odgovorni za organoleptička svojstva biljne hrane te daju boju mnogim vrstama voća i povrća (Alara, 2021). Fenolni spojevi prisutni u tropu grožđa mogu se podijeliti na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Peixoto i sur., 2018; Rebello i sur., 2013; Singh i sur., 2016) (**Slika 1**).



Slika 1 Prikaz podjele fenolnih spojeva

Fenolne kiseline sadrže jedan aromatski prsten i najmanje jednu organsku skupinu karboksilne kiseline, a dijele se na derivate benzojeve kiseline (galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, benzojeva kiselina) i derivate cimetine kiseline (cimetna, *p*-kumarna, kafeinska, ferulična, sinapinska kiselina). U biljkama se pojavljuju kao esteri ili glikozidi konjugirani s drugim prirodnim spojevima, a u manjoj mjeri u obliku slobodnih kiselina (Goleniowski i sur., 2013).

Flavonoidi su najrasprostranjenija skupina fenolnih spojeva u biljkama, a i u tropu grožđa. Njihova struktura sastoji se od ugljikovog kostura od 15 ugljika (C6-C3-C6) koji sadrži dva benzenska prstena povezanih heterocikličkim prstenom na koji je vezan kisik (Grgić i sur, 2020). Na temelju oksidacije heterocikličkog prstena, flavonoidi se mogu podijeliti u skupine:

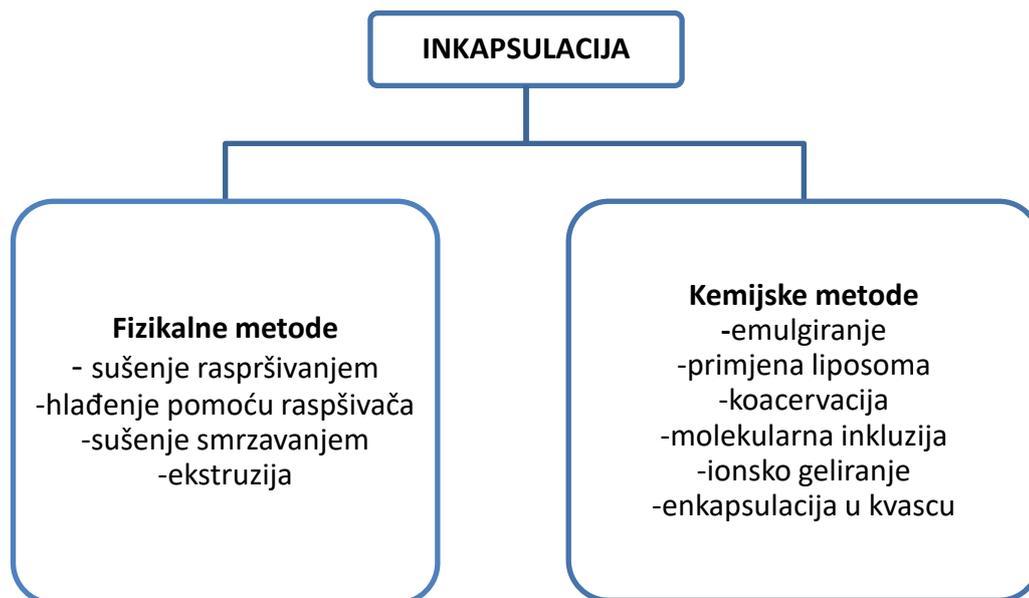
flavan-3-oli (epikatehin, katehin, epikatehin galat, galokatehin galat), flavonoli (kvercetin, kaempferol, miricetin), flavoni (luteolin, apigenin), antocijani (malvidin, peonidin, petunidin, cijanidin), flavanoni (hesperetin, naringenin) i izoflavoni (genistein, daidzein) (El Gharras, 2009). Flavonoidi su najzastupljeniji spojevi u sjemenkama grožđa, posebice flavan-3-oli i njegovi polimeri (Yu i Ahmedna, 2013), a nakupljaju se u kožici i lišću s obzirom da ih sintetizira svjetlost. Flavanoni se mogu naći u rajčicama i nekom aromatskom bilju poput metvice, ali u velikim koncentracijama prisutni su u citrusnom voću, a izoflavoni, koji se još nazivaju i fitoestrogeni, najzastupljeniji su u mahunarkama (Manach i sur., 2004; Pandey i Rizvi, 2009). Pokožica grožđa bogata je antocijanima koji su odgovorni za boju grožđa, ali posjeduju i mnoge pozitivne uloge u ljudskom zdravlju poput uloge u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti i hiperglikemije (Lavelli i sur., 2016).

Lignani su fenolni dimeri koji imaju strukturu 2,3-dibenzilbutana (struktura C6-C3-C3-C6). Sudjeluju u stvaranju građevnih blokova za stvaranje lignina, koji je odgovoran za čvrstoću biljnog staničnog zida. Čaj, kava, vino, orašasti plodovi i žitarice, samo su neke od namirnica bogate lignanima. Lignani su iznimno poželjni zbog toga što posjeduju antioksidacijska, antikancerogena, antivirusna, i insekticidna svojstva (Simpson i Amos, 2017; Grgić i sur., 2020).

Struktura stilbena temelji se na okosnici C6-C2-C6, koja se sastoji od dva aromatska prstena povezana etilenskim mostom (Pandey i Rizvi, 2009). Jedan od opsežno proučavanih stilbena je resveratrol zahvaljujući širokom spektru bioloških aktivnosti, uključujući protuupalno djelovanje, antikancerogeno djelovanje te zaštitu od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (El Khawand i sur., 2018).

2.2. INKAPSULACIJA

Inkapsulacija je proces kojim se neka aktivna tvar, koja može biti tekućina, plin ili krutina, oblaže nekim materijalom (omotačem) radi zaštite od okoline i očuvanja kemijskih, fizioloških i bioloških svojstava (Eghbal i Choudhary, 2018). Postoje različite tehnike inkapsulacije i najčešće se dijele na kemijske i mehaničke (**Slika 2**).



Slika 1 Osnovna podjela metoda inkapsulacije

U posljednjih nekoliko godina inkapsulacija je izazvala veliko zanimanje zbog mogućnosti široke primjene u različitim industrijama, primjerice za očuvanje bioaktivnih spojeva protiv razgradnje uzrokovane uvjetima okoliša (toplina, svjetlost, zrak, vlaga), poboljšavanje poželjnih svojstava namirnice, prikrivanje neugodnih mirisa i/ili okusa (Eghbal i Choudhary, 2018). Inkapsulacija se također koristi za povećanje bioraspoloživosti bioaktivnih spojeva, poput lijekova i fenolnih spojeva, na način da se upotrebom različitih materijala omotača omogućuje ciljana dostava i kontrolirano otpuštanje (Beirão-da-Costa i sur., 2013).

Omotači

Ovisno o materijalu koji se inkapsulira i željenim karakteristikama krajnjeg proizvoda, postoji širok izbor prirodnih i sintetičkih polimera koji se mogu koristiti kao omotači. Sastav omotača ima glavnu ulogu u određivanju funkcionalnih svojstava inkapsulata, isto tako utječe i na odabir prikladne metode za inkapsulaciju (Shahidi i sur., 1993). Neka od svojstava koja omotači moraju sadržavati su:

- dobra reološka svojstva pri visokim koncentracijama i lakoća rukovanja,
- sposobnost da ne reagira s materijalom koji se inkapsulira kako tijekom procesa inkapsulacije tako i tijekom skladištenja,
- topljivost u otapalima prikladnim u prehrambenim industrijama,

- nemogućnost izazivanja kemijskih reakcija sa inkapsuliranim materijalom te
- ekonomičnost (Grgić i sur., 2020).

Postoje mnogi omotači koji se koriste u procesu inkapsulacije (**Tablica 1**), ali najčešće korišteni omotači su prirodnog porijekla te su to ugljikohidrati (škrob, maltodekstrin, guma arabika, kitozan), proteini soje i sirutke, želatina i lipidi ili njihove kombinacije (Mishra, 2016).

Tablica 1 Podjela materijala za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva (Mishra 2016)

Polimeri ugljikohidrata	Biljni izvori: guma arabika, tragacanth, karaya, mesquite, guar guma, rogač, tara guma, konjac, pektin
	Mikrobni izvori: kitozan, dekstran, gelan, ksantan i curdlan guma
	Morski izvori: alginati, carrageenan
	Derivati škroba i škrob: maltodekstrini, dekstrini, ciklodekstrini, celuloza i derivati celuloze
Lipidi	Masne kiseline i alkoholi, gliceridi, voskovi, fosfolipidi, parafin
Proteini	proteini soje, graška riže isirutke, gluten, kazein, želatina

2.2.1. Maltodekstrini

Maltodekstrini su polisaharidi koji se sastoje od $\alpha(1\rightarrow4)$ vezane glukoze. Nastaju djelomičnom hidrolizom kukuruznog brašna s kiselinama ili enzimima. Kako bi pripadali istoimenoj grupi, moraju imati vrijednost dekstroznog ekvivalenta (DE) manju od 20, a ako je DE veći od 20, nazivaju se krutine kukuruznog sirupa (Madene i sur., 2006). Koriste se za inkapsulaciju hlapljivih tvari u procesima sušenja raspršivanjem i ekstruzije. Predstavljaju dobar kompromis između cijene i učinkovitosti, nemaju okusa i mirisa, lako su probavljivi, imaju nisku viskoznost i slaba svojstva emulgiranja te su dostupni u različitim molekularnim masama što su neke od prednosti zbog kojih se često upotrebljavaju (Mishra, 2016). Međutim imaju ograničenu primjenu zbog niske sposobnosti emulgiranja i zadržavanja hlapljivih komponenti, stoga se najčešće koriste u kombinaciji s drugim materijalima (Muangrat i sur., 2019).

2.2.2. Alginati

Alginati su anionski hidrofilni heteropolisaharidi kojih ima u izobilju u prirodi, a postoje i kao komponente smeđih morskih alga (*Phaeophyceae*) i kao polisaharidi nekih bakterija u tlu (Hecht i Srebnik, 2016). Sastoje se od β -D-manuronske i α -L-glukonske kiseline povezane 1 \rightarrow 4 vezom (Khajouei i sur., 2018), a njihov omjer kao i struktura alginata određuju svojstva otopine alginata te utječe na stabilnost inkapsuliranog materijala prilikom inkapsulacije. Ovaj polisaharid sadrži mnogo anionskih ili kationskih skupina u strukturi i pokazuje jedinstveno fizikalno svojstvo elektrostatske interakcije, odnosno, ima sposobnost stvaranja čvrstih gelova. Naime, dodatkom di- i trovalentnih metalnih iona kao što su dvovalentni zemnoalkalijski metali (Ca^{2+} , Sr^{2+} i Ba^{2+}) ili trovalentni Fe^{3+} i Al^{3+} ioni, ionskim interakcijama i intramolekularnim povezivanjem između skupina karboksilnih kiselina smještenih na polimernoj okosnici i kationa koji su prisutni dolazi do njihovog geliranja (Sachan i sur., 2009). Danas se alginati vrlo često primjenjuju u inkapsulaciji mnogih tvari poput stanica, DNK, mikroorganizama, hranjivih tvari te u kontroliranom oslobađanju aroma, minerala i lijekova (Bertagnolli i sur., 2014; Larsen i sur., 2003).

2.2.3. Guma tragacanth

Gume su skupina polisaharida koji se mogu prirodno proizvesti iz biljnih izvora (drveće i grmlje, sjemenke i gomolji), algi (crvene i smeđe morske alge) ili mikrobnih izvora. Neka stabla i grmovi izlučuju gume kao ljepljive izlučevine, kao odgovor na mehaničke ozljede ili biološke napade koji se obično stvrdnu kako bi zatvorili ranu i pružili zaštitu (Nussinovitch, 2009). Guma tragacanth je polisaharid kojeg proizvodi drvenasti zimzeleni grm roda *Astragalus* karakterističan za pustinjku i planinsku regiju Azije (Imeson, 1992). Sastoji se od dvije frakcije: topljive u vodi (tragacanthinska kiselina i mala količina arabinogalaktana) i netopljive frakcije, ali koja bubri u vodi, nazvane basorin. Jedna je od najotpornijih guma na kiselinu i najučinkovitiji prirodni emulgator za kisele emulzije ulja u vodi te se često koristi kao stabilizator, emulgator i zgušnjivač u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Weiping i Branwel, 2000). Fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva gume tragacanth znatno ovise o vrsti, stoga je prilikom odabira odgovarajuće vrste gume tragacanth bitno znati njenu buduću primjenu. Unatoč relativno visokoj cijeni, ova guma još uvijek privlači pažnju mnogih prehrambenih industrija zbog svojih izvanrednih i jedinstvenih

svojstava. Međutim, održiva opskrba gumom *tragacanth* glavni je problem koji ograničava njenu komercijalnu primjenu u mnogim industrijama (Nejatian i sur., 2020).

2.2.3. Guma arabika

Guma arabika je polisaharid koja je eksudat iz *Acacia arabica* grana i stabljika. Sastoji se od D-glukonske kiseline, D-galaktoze, L-ramnoze i L-arabinoze. Okosnicu gume arabike čine 1,3-vezama povezane β -D-galaktopiranozilne jedinice s 1, 6-vezama povezanim bočnim lancima galaktopiranoze (Koyyada i Orsu, 2021). Osnovna svojstva koja čine gumu arabiku jednu od najčešće korištenih omotača iz skupine guma i koja omogućuju njezinu svestranu primjenu u većini metoda inkapsulacije su niska viskoznost, dobra topljivost, sposobnost emulgiranja i sposobnost zadržavanja hlapljivih komponenti. Ipak, njezina primjena je ograničena s obzirom na cijenu i dostupnost u usporedbi s drugim ugljikohidratima, a također djeluje kao polupropusna membrana što utječe na veću podložnost oksidaciji (Mishra, 2016).

Guma arabika posjeduje antibakterijska, nutritivna, hipoglikemijska i imunosupresivna svojstva zbog čega se u farmaceutskoj industriji koristi kao sredstvo za zgušnjavanje, emulgiranje, suspendiranje, ublažavanje mirisa te zacjeljivanje rana (Koyyada i Orsu, 2021).

2.2.4. Metoda liofilizacije

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem najprikladnija je tehnika za dehidraciju, odnosno sušenje materijala osjetljivih na toplinu, ali isto tako i za njihovu inkapsulaciju (Desai i Park, 2005; Rezvankhah i sur., 2019). To je proces koji obuhvaća tri faze: zamrzavanje, primarno sušenje, odnosno sublimacija leda te sekundarno sušenje koje se još naziva i desorpcija. Uzorak koji se inkapsulira sadrži aktivnu komponentu i omotač te je u obliku tekuće suspenzije i kao takav se zamrzava, a voda koja se nalazi u uzorku pretvara se u kristale leda. U zamrznutom proizvodu postoji mala količina vode koja se ne zamrzne nego ostane tekuća, a naziva se vezana voda. Faza primarnog sušenja je proces sublimacije leda iz zamrznutog proizvoda, a potom se u drugoj fazi sublimirani led pretvara u paru i izlazi kroz dehidrirani uzorak. Vodena para prolazi kroz komoru do kondenzatora. U završnoj fazi, vodena para se kondenzira i na površini uzorka se mogu vidjeti pore na mjestu gdje su bili kristali leda. U sekundarnom koraku sušenja, voda koja nije izolirana kao led niti sublimirana uklanja se iz proizvoda (Pikal i sur., 1990; Tang i Pikal, 2004).

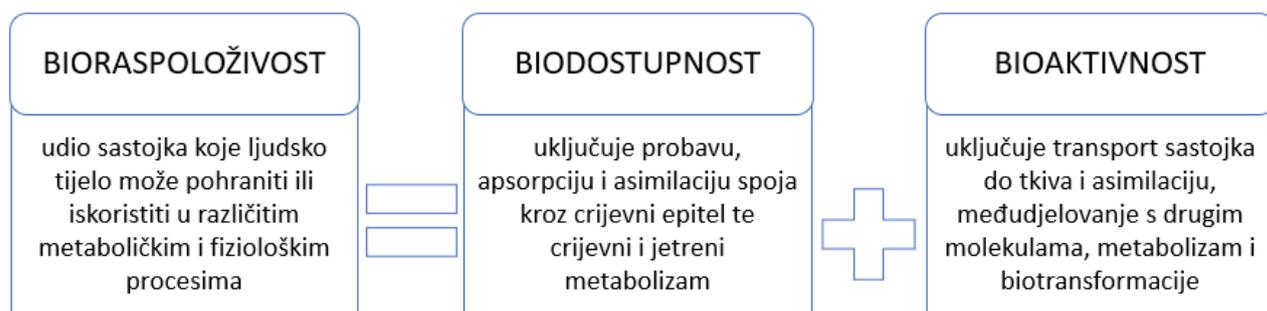
Ukoliko je liofilizacija uspješno provedena većina izvornih svojstava liofiliziranog materijala kao što su oblik, veličina, izgled, okus, boja, miris i tekstura će ostati nepromjenjena (Ceballos i sur., 2012). Produkt inkapsulacije liofilizacijom inkapsulirana biti će u praškastom obliku, a učinkovitost inkapsulacije, kontrolirano otpuštanje ili očuvanje biološke aktivnosti aktivne tvari uglavnom će ovisiti o sastavu i strukturi omotača (Ray i sur., 2016). Glavni nedostaci ove metode su velika potrošnja energije i dugo vrijeme procesa. Osim toga, tijekom procesa između aktivne tvari i okoline stvara se barijera s vrlo poroznom strukturom koja daje slabu zaštitu kada je potrebno produljeno oslobađanje inkapsulirane aktivne komponente poput lijekova (Zuidam i Shimoni, 2009).

Usprkos tome, liofilizacija je najprikladnija i najčešće korištena metoda sušenja termički osjetljivih proizvoda zbog brojnih prednosti kao što su: dugo razdoblje očuvanja zbog niskog udjela vode u produktu, minimalna kontaminacija zbog mogućnosti rada u aseptičnim uvjetima, minimalan gubitak hlapljivih i termoosjetljivih komponenti, smanjena oksidacija tvari zbog rada pri sniženom tlaku (Kunal i sur., 2015). Iz navednih razloga, vrlo je poželjna metoda za inkapsulaciju fenolnih spojeva (Mourtzinou i Goula, 2019).

2.3. OTPUŠTANJE FENOLNIH SPOJEVA

Fenolni spojevi opsežna su skupina prirodnih spojeva i posjeduju raznoliku biološku aktivnost poput antioksidativnog, antikancerogenog, protuupalnog, antialergijskog, antivirusnog, antimikrobnog djelovanja i još mnogih (Bucić-Kojić i sur., 2020). Ipak, zdravstvene dobrobiti unesenih fenolnih spojeva putem namirnica uvelike ovise o njihovoj biorasploživosti u probavnom sustavu.

Biorasploživost uključuje biodostupnost i bioaktivnost fenolnih spojeva (**Slika 3**) (Grgić i sur., 2020). Određivanje biorasploživosti aktivnih tvari kao što su fenolni spojevi u prehrambenim proizvodima je iznimno zahtjevno zbog kompleksnosti namirnice koja sadrži fenolne spojeve uz druge komponente i etičkih pitanja u istraživanju te zbog toga većina istraživanja fokus stavlja na ispitivanje biodostupnosti. Biodostupnost bioaktivnog spoja se može definirati kao količina tog bioaktivnog spoja koji se oslobađa iz neke namirnice u probavni trakt te se može apsorbirati (Carbonell-Capella i sur., 2014).



Slika 3 Povezanost pojmova: bioraspoloživost, biodostupnost i bioaktivnost (preuzeto i prilagođeno prema Grgić i sur., 2020)

Fenolni spojevi kao komponente hrane se ne oslobađaju u potpunosti, a oni oslobođeni se slabo apsorbiraju. Apsorbirani fenolni spojevi se u pravilu ne mogu se u potpunosti transportirati do mjesta djelovanja kako bi izvršili svoje bioaktivne učinke poput antioksidacijskog djelovanja. Osim toga, njihova fizikalno-kemijska svojstva uključujući stupanj polimerizacije ili glikozilacije, polaritet i interakcije s drugim komponentama (vlakna, lipidi, proteini) hrane, kao i utjecaje okoline poput pH vrijednosti i temperature važni su čimbenici koji mogu utjecati na njihovu biodostupnost (Shahidi i Peng, 2018).

Kao što je navedeno ranije, biodostupnost uključuje probavu i proces apsorpcije. Probava uključuje razgradnju velikih netopivih molekula hrane, potpomognuta različitim probavnim enzimima i odgovarajućim pH vrijednostima, u manje topive molekule (Shahidi i Peng, 2018). Kemijska struktura fenolnih spojeva i način na koji su vezani unutar namirnice utječu na njihovu apsorpciju u pojedinim fazama probavnog sustava (Lingua i sur., 2018). U namirnicama su prisutni u slobodnom, konjugiranom i netopivom vezanom obliku. Slobodni fenolni spojevi su u obliku aglikona, odnosno bez vezane jedinice šećera, dok konjugirani oblici sadrže vezani šećer te se nazivaju glikozidi. Fenolni spojevi u obliku aglikona i glikozida većinom se lako oslobađaju iz stanične membrane namirnice u probavnim sokovima i dalje apsorbiraju u probavnom sustavu (Shahidi i Peng, 2018; Grgić i sur., 2020). Netopivi vezani fenolni spojevi kovalentno su vezani za neprobavljive komponente namirnice kao što su polisaharidi (pektin, hemiceluloza, celuloza i arabinoksilan), strukturni proteini i visoko polimerizirani fenoli poput tanina i lignina (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Žvakanje u ustima je prva faza probave fenolnih spojeva, koja se uglavnom temelji na usitnjavanju namirnice i njenom miješanju sa slinom. Usitnjavanje namirnice tijekom žvakanja omogućuje djelomično oslobađanje fenolnih spojeva, ali također uzrokuje povećavanje površine gdje dolazi do

interakcija sa probavnim enzimima i proteinima iz sline (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Kada dospiju u želudac, fenolni spojevi se oslobađaju iz namirnice i hidroliziraju u kiseloj pH okolini, ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi i interakciji s komponentama namirnice unutar koje se nalaze (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014; Arenas i Trinidad, 2017). Tijekom želučane faze moguća je apsorpcija slobodnih fenolnih spojeva poput fenolnih kiselina, a neapsorbirani fenolni spojevi prelaze u tanko crijevo i pH se mijenja od kiselog (pH 2–4) do neutralnog (pH 7). Kiseli uvjeti prisutni na početku probave u tankom crijevu mogu pogodovati prisutnosti fenolnih spojeva. Kako pH raste, žučne soli te enzimi koje luči gušterača se aktiviraju i pridonose apsorpciji fenolnih spojeva. Također, istraživanja su pokazala da u ovoj fazi dolazi i do smanjenja biodostupnosti izoflavonoida i flavonoida (Chitchumroonchokchai i sur., 2012) i razgradnje antocijana (Bohn, 2014). Nadalje, ukoliko se radi o voću ili povrću, ovisno o vrsti i dijelu biljke, udio vezanih fenolnih spojeva varira od 20 do 90% (Acosta-Estrada i sur., 2014), a samo manje od 10% ih može proći kroz epitel tankog crijeva u cirkulacijski sustav i izvršiti bioaktivne funkcije u ciljanim stanicama i/ili tkivu. Ostatak neapsorbiranih fenolnih spojeva probavnim sokovima prijelazi u debelo crijevo i ondje se može metabolizirati i otpustiti putem fermentacije u debelom crijevu, a zatim se može apsorbirati i dalje metabolizirati (Shahidi i Yeo, 2016). Vezani fenolni spojevi djelomično ili vrlo malo se otpuštaju, a samo mali dio njih uspije proći kroz crijevni epitel i doći do krvotoka što dovodi do niske biodostupnosti u tankom crijevu (Peng i sur., 2017; Shahidi i Yeo, 2016). Fenolni spojevi se opsežno metaboliziraju mikroflorom debelog crijeva, uglavnom u fenolne kiseline manje molekularne mase, koje se bolje apsorbiraju kroz stjenku debelog crijeva nego njihovi izvorni spojevi, povećavajući biodostupnost fenolnih spojeva (Williamson i Clifford, 2017). Mikrobiota debelog crijeva oslobađa jednostavne aromatske spojeve iz razgradnje aglikona, uključujući hidroksifenilacetatne kiseline iz flavonola, hidroksifenilpropionske kiseline iz flavona i flavanona te fenilvalerolaktone i hidroksifenilpropionske kiseline iz flavanola (Ozidal i sur., 2016).

2.3.1. *In vitro* statički model ispitivanja biodostupnosti fenolnih spojeva

Modeli koji simuliraju gastrointestinalnu probavu u laboratorijskim uvjetima nazivaju se gastrointestinalni modeli i mogu biti statički ili dinamički. Gastrointestinalna probava *in vitro* simulira fiziološke postupke, kao što su vrijeme prolaza, enzimski uvjeti i pH, koji se odvijaju u ljudskom probavnom sustavu. U statičkim modelima, produkti probave su imobilizirani i ne

oponašaju fizičke procese poput rezanja, miješanja, hidratacije i drugih. U slučaju dinamičkih modela, kontinuirane promjene u fizikalno-kemijskim uvjetima, uključujući promjene pH od usta do želuca i crijeva, mijenjanje koncentracije lučenja enzima i peristaltičke sile u gastrointestinalnom traktu se mogu provoditi radi bolje simulacije *in vivo* uvjeta (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

Statički model, usprkos svojim ograničenjima, omogućuje procjenu biodostupnosti *in vitro* modelima i može korelirati s rezultatima dobivenim iz istraživanja na ljudima i pomoću životinjskih modela (Liang i sur., 2012). Ovo su najčešće korišteni probavni modeli u kojima se želučana faza sastoji od hidrolize pepsina u homogeniziranoj hrani pri pH 1–2 i temperaturi 37 °C tijekom određenog vremenskog razdoblja (1–3 h). Nakon toga, crijevna faza može se odvijati u istom reaktoru uz dodatak enzima gušterače sa ili bez žučnih soli pri pH 6–7 u trajanju od 1 do 3 sata. Prilikom uporabe statičkog modela često se upotrebljavaju velike količine otopina koje predstavljaju probavne sokove, a mehaničke sile uzrokovane kontinuiranim miješanjem nisu reprezentativne za složene peristaltičke pokrete (Kong i Singh, 2008). Statički modeli ne oponašaju dinamičke procese koji se odvijaju tijekom ljudske probave, kao što su stalne promjene u pH vrijednostima, sekrecija ili pražnjenje želuca (Guerra i sur., 2012) što im je glavni nedostatak.

2.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE OTPUŠTANJA FENOLNIH SPOJEVA

Otpuštanje nekog aktivnog sastojka poput inkapsuliranih fenolnih spojeva ili primjerice lijekova vrlo je važno svojstvo koje predstavlja preduvjet za njegovu apsorpciju u ljudskom organizmu. Pomoću matematičkog modeliranja, moguće je pomoću matematičkih jednadžbi opisati funkcionalnu ovisnost otpuštanja aktivne tvari o vremenu trajanja procesa otpuštanja (Bruschi, 2015). Matematički modeli su važan alat za dizajniranje farmaceutskih formulacija, procjenu procesa oslobađanja lijeka *in vitro* i/ili *in vivo* i za postizanje kontroliranog otpuštanja aktivne tvari (Peppas i Narasimhan, 2014). Iako postoji nekoliko mehanizama koji mogu utjecati na kontrolirano otpuštanje, tri glavna mehanizma uključena u otpuštanje bioaktivnih spojeva iz inkapsulata su: difuzija, bubrenje, razgradnja ili erozija (Leong i Langer, 1988).

Difuzija

Difuzija je prevladavajući mehanizam kada se događa otpuštanje aktivne tvari iz inkapsulata. Zbog razlike u koncentraciji aktivne tvari u inkapsulatu i izvan njega dolazi do difuzije aktivne tvari s mjesta više na mjesto niže koncentracije (Ko i Gunasekaran, 2014). Inkapsulirana čestica tijekom difuzije može ostati nepromijenjena ili se njen izgled i oblik mogu promijeniti zbog pojave bubrenja, skupljanja, fragmentacije ili erozije. Na brzinu otpuštanja inkapsuliranih bioaktivnih spojeva mogu utjecati mnogi parametri uključujući karakteristike spoja (polaritet ili molekularna masa), karakteristike omotača (fizikalno-kemijska svojstva, interakcije sa aktivnim spojem, polaritet, reologija), fizikalno-kemijska svojstva inkapsulata (oblik, veličina, struktura), brzina protoka okolne tekućine i gradijent koncentracije bioaktivnih tvari između omotača i okolne tekućine ili plina (McClements, 2010).

Bubrenje

Bubrenje inkapsulata događa se kao rezultat apsorpcije otapala. Brzina otpuštanja bioaktivnih tvari može se odrediti brzinom bubrenja i vremenom potrebnim da bioaktivna tvar difundira kroz nabubreni sustav (McClements, 2010). Na bubrenje inkapsulata može utjecati prisutnost bilo kojeg sastojka koji djeluje kao osmolit, uzrokujući prodiranje otapala u inkapsulirani sustav. Ovaj mehanizam otpuštanja može se kontrolirati odgovarajućim odabirom polimera, odnosno omotača, kao i kontrolom nad uvjetima okoline kao što su temperatura i pH okolne otopine (Jafari i sur., 2017).

Razgradnja ili erozija

Razgradnja inkapsulata se najčešće spominje u smislu biorazgradnje te se odnosi na postupak prekidanja lanca ili razgradnje biomaterijala pomoću mikroorganizmima. Nakon razgradnje polimera otpuštaju se spojevi jezgre koji su raspršeni unutar polimera (Ko i Gunasekaran, 2014). Kod jedne skupine biorazgradivih materijala površina inkapsulata se smanjuje tijekom vremena što kao posljedicu ima smanjenje otpuštanja aktivne tvari. Kod druge skupine, inkapsulat se postupno razgrađuje u prvoj fazi, međutim, u drugoj fazi, udio razgradnje aktivne tvari se ubrzava zbog fenomena autokatalize, a glavina erodira tijekom relativno kratkog razdoblja (Ko i Gunasekaran, 2014).

Erozija je mehanizam u kojem se oslobađanje bioaktivnih sastojaka može dogoditi bez njihovog transporta (Jafari i sur., 2017). Erozija može biti potaknuta fizikalnim čimbenicima kao što je visoka temperatura, kemijskim čimbenicima kao što je utjecaj jake kiseline ili baze te enzimskom aktivnosti. Postoje dvije vrste erozije: masovna erozija (engl. *bulk*) – razgradnja se događa kroz cijelu česticu i površinska erozija – degradacija se događa samo na

vanjskoj strani čestice (McClements, 2010). Profil otpuštanja je kontroliran brzinom kojom se erozija događa, a na njega utječu svojstva inkapsulata i okolišni čimbenici odgovorni za eroziju te je li mehanizam erozije površinski ili masovni.

U biorazgradivim polimerima dominantni mehanizam je difuzija, ali u biorazgradivim polimerima također su uključeni bubrenje i erozija. Na temelju ove kategorizacije često se razvijaju matematički modeli kontroliranog otpuštanja aktivne tvari.

Ciljevi primjene matematičkog modeliranja su razjašnjavanje prijenosa mase i kemijskih reakcija koje se odvijaju u određenim sustavima uključujući inkapsulate (Lokhandwala i sur., 2013). Pomoću prikladnih matematičkih modela moguće je predvidjeti utjecaj fizikalno-kemijskih parametara inkapsulata (dimenzije, geometrija, tekstura) i učinkovitost inkapsulacije na mehanizam otpuštanja aktivne tvari uz smanjen broj potrebnih eksperimenata što dovodi do ekonomsko-energetske uštede zbog smanjenog broja potrebnih eksperimenata (Arifin i sur., 2006; Peppas i Narasimhan, 2014, Siepmann i Peppas, 2012). Podaci o kinetici otpuštanja aktivne tvari iz inkapsulata ključni su za istraživanje potencijala upotrebe inkapsuliranih čestica u prehrambenim sustavima (Assadpour i sur., 2017). Ukoliko je otpuštanje vrlo sporo, moguće je korištenje inkapsulata u proizvodnji funkcionalne hrane i hrane sa dodanom vrijednošću. Nasuprot tome, velike brzine otpuštanja aktivnih tvari iz inkapsuliranih čestica povećavaju njihovu izloženost i smanjuju njihovu zaštitu (Robert i sur., 2012).

Prema Siepmann i Siepmann (2013), postoje četiri elementa koja treba pažljivo razmotriti u primjeni matematičkog modeliranja za opisivanje procesa kontroliranog otpuštanja:

1. što je više parametara uzeto u obzir u modelu, točnija je sposobnost predviđanja procesa modelom iako primjena velikog broja parametara čini modele složenim te je stoga bolje uzeti u obzir samo glavne parametre s najvećim utjecajem na promatrani proces;
2. usporedbu između teoretskih i eksperimentalnih podataka potrebno je napraviti ili prilagođavanjem modela eksperimentalnim rezultatima ili usporedbom teorijskih podataka neovisno o eksperimentalnim podacima;

3. niti jedan od predloženih modela ne može se koristiti za sve vrste sustava, točnije neki od njih mogu se koristiti za širok raspon sustava, dok drugi mogu imati ograničenu primjenu za određene vrste sustava;
4. ponekad postoje određeni eksperimentalni podaci koji nisu u skladu s rezultatima modela, unatoč dobrom slaganju između različitih eksperimentalnih i teorijskih rezultata.

Dalje u radu su opisani su matematički modeli korišteni u izradi diplomskog rada. Svi ispitani modeli temelje se na Fickovom zakonu difuzije, koji je temelj raznih empirijskih i teorijskih matematičkih modela, za opisivanje kontroliranog otpuštanja tvari, dostupnih u literaturi.

2.4.1. Model prvog reda

Model prvog reda slijedi Fickov zakon difuzije, odnosno brzina otpuštanja aktivne tvari ovisi o gradijentu koncentracije. Drugim riječima, pokretačka snaga tijekom otpuštanja je razlika između koncentracije aktivne tvari unutar i izvan omotača inkapsuliranog materijala. Model prvog reda može se opisati izrazom (1):

$$C_t = C_0 e^{-k_1 t} \quad (1)$$

gdje su C_0 – početna koncentracija aktivne tvari u otapalu u koje se otpušta (u većini slučajeva $C_0 = 0$) iz inkapsulata, C_t – koncentracija otpuštene tvari u otapalu u vremenu t , a k_1 – konstanta modela prvog reda. Koncentracija aktivne tvari unutar inkapsulirane čestice opada tijekom procesa zbog otpuštanja, a budući da se pretpostavlja da je takvo otpuštanje linearno, u ovoj hipotezi mogu postojati razlike između eksperimentalnih i predviđenih krivulja otpuštanja (Manca i Rovaglio, 2003). U ovom modelu, koncentracija otpuštene aktivne tvari proporcionalna je koncentraciji preostale inkapsulirane tvari, a otpušta se u ovisnosti o vremenu trajanja procesa (Bruschi, 2015).

2.4.2. Higuchi model

Godine 1961. Higuchi je objavio najpoznatiju i najčešće korištenu matematičku jednadžbu za opisivanje brzine otpuštanja lijekova (Higuchi, 1961) koja je kasnije nadopunjena 1962. (Higuchi, 1962) i 1963. godine (Higuchi, 1963) i najčešće se opisuje izrazom (2):

$$C_t = k_H \sqrt{t} \quad (2)$$

gdje je C_t – koncentracija otpuštene aktivne tvari u vremenu t , a K_H – Higuchijeva konstanta.

Ova tri rada omogućila su razvoj mnogih teorijskih modela za opisivanje otpuštanja aktivnih tvari koje su manje topljive kao i vrlo topljive, sadržane u čvrstim ili polukrutim česticama (Costa i Lobo, 2001).

Postoje pretpostavke koje treba slijediti prilikom korištenjem Higuchi modela (Malekjani i Jafari, 2020; Siepmann i Peppas, 2012):

- matriks sadrži početnu koncentraciju aktivne tvari veću od topljivosti aktivne tvari,
- debljina matriksa veća je od veličine molekula aktivne tvari,
- difuzija je jednosmjerna i konstantna
- bubrenje i otapanje matriksa je zanemarivo i
- savršeni uvjeti tonjenja postižu se u trenutku ispuštanja matriksa.

2.4.3. Hixson-Crowell model

Hixson-Crowell model ili model kubnog korijena opisuje otpuštanje aktivne tvari iz sustava gdje postoji promjena na površini omotača i promjena u veličini čestica, odnosno ovim modelom pretpostavlja se da je površina čestice koja se smanjuje u veličini proporcionalna kubičnom korijenu volumena te se opisuje izrazom (3):

$$C_0^{1/3} - C_t^{1/3} = K_{HC}t \quad (3)$$

gdje je C_0 – početna koncentracija aktivne tvari u otapalu u koje se otpušta, C_t – koncentracija otpuštene tvari u otapalu u vremenu t , a K_{HC} – konstanta brzine otpuštanja Hixson-Crowell modela (Hixson i Crowell, 1931).

U ovom izrazu pretpostavlja se da je brzina otapanja kroz inkapsuliranu česticu ograničavajući faktor. Ovaj je model primjenjiv na planarne strukture gdje se otpuštanje odvija iz sustava paralelnim s površinom aktivne tvari (Bruschi, 2015).

2.4.4. Korsmeyer-Peppas model

Korsmeyer i sur. (1983) i Ritger i Peppas (1987a, 1987b) predložili su jednostavnu jednadžbu za opisivanje kontroliranog oslobađanja iz polimernih sustava. Ovaj je model također poznat kao engl. *power law* te je navedeno da postoji eksponencijalna proporcionalnost između

količine oslobođene bioaktivne tvari i vremena otpuštanja (Lao i sur., 2011). Ukoliko je glavni mehanizam otpuštanja difuzija, dijagram otpuštene količine u odnosu na kvadratni korijen iz vremena bio bi linearan, ali ako se mehanizam oslobađanja ne ponaša prema Fickovom zakonu difuzije, opća jednađba je sljedeća (4):

$$\frac{C_t}{C_\infty} = k_{KP}t^n \quad (4)$$

gdje je C_t – koncentracija otpuštene tvari u otapalu u vremenu t , a C_∞ – ravnotežna koncentracija otpuštene tvari, k_{KP} – konstanta brzine (koja ovisi o strukturnim promjenama i geometriji sustava, tzv. konstanta brzine otpuštanja), a n – eksponent otpuštanja koji ovisi o mehanizmu otpuštanja.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj različitih omotača (natrij alginata, kombinacije natrij alginata i maltodekstrina: DE 16,5-19,5; kombinacije natrij alginata i gume arabike te natrij alginata i gume tragacanth) korištenih za inkapsulaciju ekstrakata tropa grožđa sorte cabernet sauvignon na otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsuliranih čestica u uvjetima simulirane probave *in vitro*. Sušenje zamrzavanjem, odnosno liofilizacija, primijenjeno je kao metoda inkapsulacije ekstrakta. Nadalje, cilj je bio ispitati antioksidacijsku aktivnost alikvota probavnih tekućina tijekom otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsuliranih čestica, te opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva pomoću matematičkih modela.

3.2. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na tropu grožđa sorte cabernet sauvignon, berba 2018, prikupljeno iz vinarije Erdut. Prije upotrebe, trop grožđa je osušen na zraku (~ 48 h pri temperaturi od 25-27 °C) i zatim samljeven na veličinu čestica od ≤ 1 mm pomoću ultracentrifugalnog mlina (Retsch ZM200, Haan, Njemačka).

3.2.1. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije: natrijev hidroksid, natrijev klorid, natrijev acetat (bezvodni), natrijev hidrogen fosfat, natrij hidrogen karbonat, kalijev klorid, kalijev dihidrogen fosfat, kalcijev klorid dihidrat, magnezijev klorid heksahidrat, apsolutni etanol (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska); 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), guma arabika (prah), guma tragacanth, natrijeva sol alginske kiseline iz smeđe alge niske viskoznosti, maltodekstrin (dekstrozni ekvivalent 16,5-19,5), monohidrat galne kiseline (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD); Folin Ciocalteu reagens (CPA chem, Bogomilovo, Bugarska); željezo(III)klorid heksahidrat (99+%), natrij dihidrogen fosfat hidrat (Acros Organics, New Jersey, SAD); klorovodična kiselina (Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka), Trolox, amonij karbonat (Acros Organics, Geel, Belgija); amonij persulfat (Honeywell, Seelze, Njemačka); ledena octena kiselina (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska).

3.2.2. Priprema ekstrakta

Suhi koncentrirani ekstrakt tropa grožđa korišten za inkapsulaciju pripremljen je kako je opisano u odlomcima *Ekstrakcija* i *Uparivanje*.

Ekstrakcija

Fenolni spojevi iz tropa grožđa ekstrahirani su konvencionalno kruto-tekućom ekstrakcijom u vodenoj kupelji sa trešnjom (Julabo SW-23, Seelbach, Njemačka) prema prethodno određenim optimalnim uvjetima (Šelo i sur., 2023). Ukratko, samljeveni trop grožđa (1,5 g) izvagan je u tamne staklene bočice sa čepom te je dodana svježe pripremljena 50%-tna vodena otopina etanola (60 mL). Bočice su zatim stavljene u vodenu kupelj zagrijanu na 80 °C te se ekstrakcija provodila 120 minuta pri trešnji od 200 rpm. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani na centrifugi (Hermle Z 326 K, Labortechnik GmbH, Njemačka) na 11 000 × *g* u trajanju od 10 min. Centrifugiranjem su dobivena dva sloja – kruti trop i tekući ekstrakt obogaćen fenolnim spojevima. Tekući ekstrakt je odvojen i uparen do suhog.

Uparivanje

Uparavanje tekućeg ekstrakta provedeno je na rotavaporu (Büchi, R -210, Flawil, Švicarska). Prije uparivanja, vodena kupelj rotavapora je zagrijana na 50 °C. Tekući ekstrakt prenesen je u tikvicu s okruglim dnom, koja je postavljena na rotavapor, a zatim uparen pod vakuumom ($p_v = 48$ mbar) do suhog. Nakon uparavanja, suhi ekstrakt ostrugan je s površine tikvica te je korišten za inkapsulaciju.

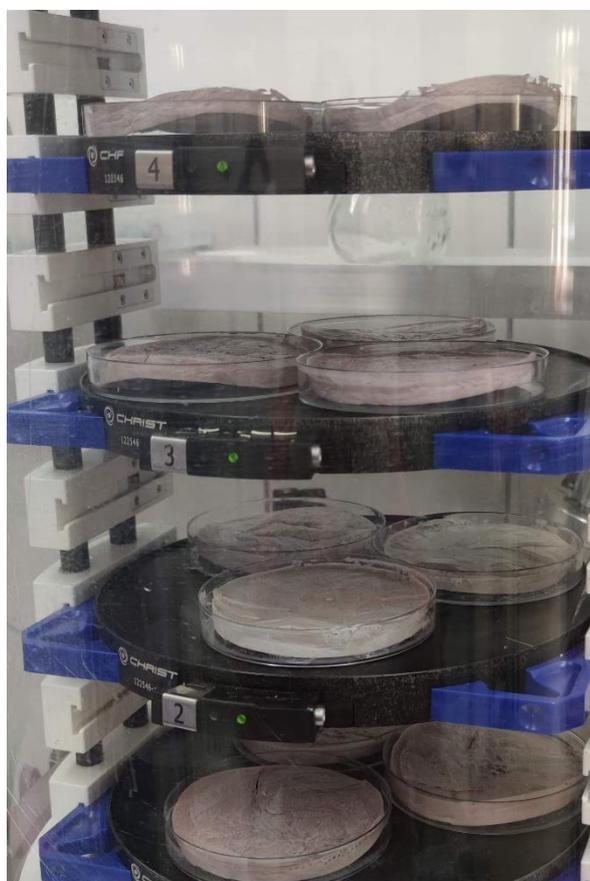
3.2.3. Inkapsulacija metodom liofilizacije

Inkapsulacija ekstrakta tropa grožđa provedena je sušenjem zamrzavanjem pomoću liofilizatora (Alpha 2-4 LSCplus, Christ, Osterode am Harz, Njemačka). Suhi upareni ekstrakt tropa grožđa (1,04 g) otapan je u 20,8 mL 30%-tnog etanola u trajanju od 30 min, a zatim je dodana destilirana voda kako bi ukupni volumen smjese bio 100 mL. Smjesa je otapana još 60 min, a zatim centrifugirana na 11 000 × *g* 5 min kako bi se odvojio neotopljeni ekstrakt tropa grožđa. Nakon centrifugiranja, 90 mL tekućeg ekstrakta je korišteno za inkapsulaciju. U tekući ekstrakt dodan je omotač(i) u potrebnim koncentracijama kako je prikazano u **Tablici 2** te je otapanje provedeno 24 sata u svrhu potpunog otapanja omotača. Idući dan, ekstrakti s omotačem(ima) preneseni su u tikvice sa okruglim dnom te su uparavani na rotavaporu ($T = 50$ °C, $p_v = 48$ mbar) približno 10 min kako bi se otpario prisutni etanol. Zatim su se uzorci

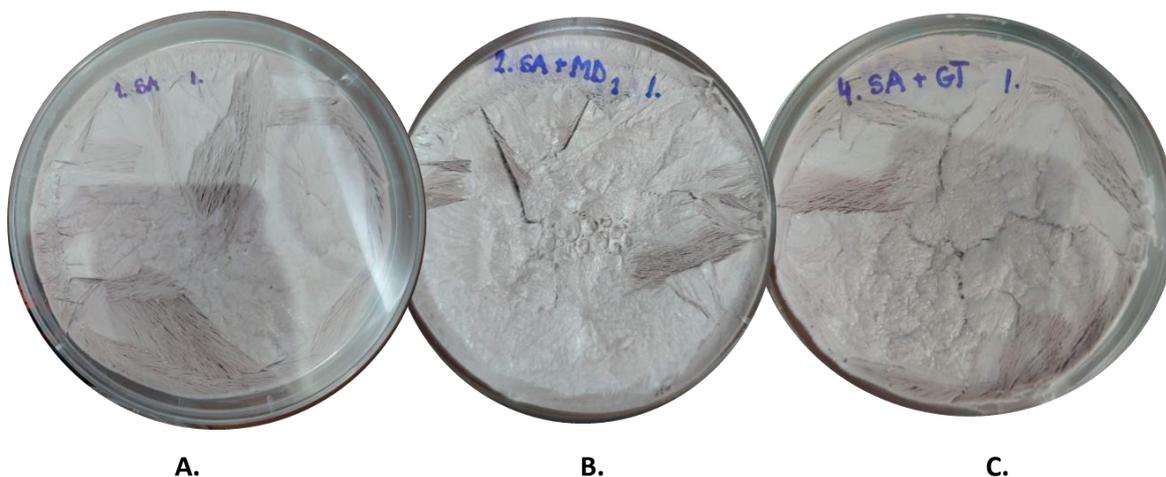
prenijeli u plastične Petrijeve posude i zamrznuli na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći u zamrzivaču (SWUF Ultra Low Temperature Smart Freezer, Witeg, Wertheim, Njemačka). Zamrznuti uzorci stavljeni su na, prethodno zamrznute, plitice liofilizatora te je komora liofilizatora spuštena. Zatim je pokrenut program sušenja čiji su uvjeti: $T = -83\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p_v = 0,250\text{ mbar}$, a uzorci su sušeni 24 h.

Tablica 2 Omotači korišteni za inkapsulaciju liofilizacijom i njihove koncentracije

OZNAKA	OMOTAČ	$c, (\%, w/v)$
SA	natrij alginat	3
SA+MD	natrij alginat	3
	maltodekstrin (DE 16,5-19,5)	1,2
SA+GT	natrij alginat	3
	guma tragacanth	0,15
SA+GA	natrij alginat	3
	guma arabika	1,6



Slika 4 Uzorci u komori liofilizatora tijekom procesa liofilizacije



Slika 5 Ekstrakt inkapsuliran metodom liofilizacije sa omotačima natrij alginatom (**A**), kombinacijom natrij alginata i maltodekstrina (**B**) te natrij alginata i gume tragacanth (**C**)

Inkapsulirani uzorci su, odmah nakon sušenja zamrzavanjem, usitnjeni s tučkom u tarioniku te čuvani u eksikatoru u plastičnim vrećicama sa zatvaračem do analiza.

3.2.4. *In vitro* otpuštanje fenolnih spojeva

In vitro otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsulata provedeno je korištenjem standardizirane INFOGEST metode (Brodkorb i sur., 2019) bez enzima uz određene modifikacije (Martinović i sur., 2023). Otpuštanje fenolnih spojeva praćeno je kroz tri faze – oralnu fazu, želučanu fazu i crijevnu fazu.

Priprema otopina

Za svaku fazu pripremljene su prikladne otopine: oralna otopina (engl. *Simulated Salivary Fluid*, SSF), želučana otopina SGF (engl. *Simulated Gastric Fluid*, SGF) i crijevna otopina SIF (engl. *Simulated Intestinal Fluid*, SIF) koje su sadržavale otopine elektrolita. Osnovne otopine elektrolita pripremljene su u koncentracijama prikazanim u **Tablici 3**.

Tablica 3 Koncentracije osnovnih otopina za pripremu otopina korištenih za *in vitro* otpuštanje

	COSNOVNA OTOPINA (g/L)
KCl	37,3
KH ₂ PO ₄	68
NaHCO ₃	84
NaCl	117
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5
(NH ₄) ₂ CO ₃	48
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44,1

Probavne otopine SSF, SGF i SIF pripremljene su na način da je u 100 mL redestilirane vode dodana osnovna otopina kako je navedeno u **Tablici 4**, a potom je volumen svake otopine nadopunjen do 400 mL redestiliranom vodom.

Prije provedbe *in vitro* otpuštanja, pripremljene su i otopine 1 M HCl-a i 0,1 M NaOH za podešavanje pH tijekom *in vitro* otpuštanja. Prije provedbe otpuštanja, sve pripremljene otopine zagrijane su na 37 °C.

Tablica 4 Volumeni osnovnih otopina potrebni za pripremu otopina SSF (engl. *Simulated Salivary Fluid*), SGF (engl. *Simulated Gastric Fluid*) i SIF (engl. *Simulated Intestinal Fluid*)

	SSF	SGF	SIF
	V _{OŠNOVNE OTOPINE} (mL)	V _{OŠNOVNE OTOPINE} (mL)	V _{OŠNOVNE OTOPINE} (mL)
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	6,8	25	42,5
NaCl	-	47,2	9,6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,5	0,1	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,5	-

Postupak

Kako bi se započeo postupak otpuštanja odnosno oralna faza, u čašicu je izvagano 100 mg inkapsuliranog ekstrakta tropa grožđa te je dodano 4 mL otopine SSF i 25 µL CaCl₂(H₂O)₂ te je izmjeren pH koji treba iznositi 7 ± 0,1. Ukoliko je bilo potrebno, pH je podešen odgovarajućom otopinom (1 M HCl ili 0,1 M NaOH) te je ukupni volumen od 10 mL nadopunjen redestiliranom vodom. Čašica s smjesom je potom grijana na magnetskoj

mješalici na 37 °C uz konstantno miješanje o 200 rpm. Oralna faza završena je nakon 3 minute te je odvojeno 2 mL uzorka, a 2 mL SSF otopine je vraćeno u čašicu s smjesom. Korištenje karbonatnih soli u otopinama SSF, SGF i SIF zahtijeva korištenje zatvorenih spremnika s ograničenim prostorom iznad otopina jer se u otvorenim posudama oslobađa ugljikov dioksid što uzrokuje porast pH vrijednosti. Zbog toga je potrebno da tijekom provedbe otpuštanja, čašica bude poklopljena satnim stakalcem u svrhu izbjegavanja promjene pH vrijednosti.

Nakon završetka oralne faze i uzorkovanja, započeta je želučana faza. Dodano je 8 mL SGF otopine te 5 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ i pH je podešen na 3. Uzimajući u obzir volumen HCl-a potreban za podešavanje pH, dodana je redestilirana voda kako bi ukupni volumen cijele smjese bio 20 mL. Čašica je postavljena na magnetnu miješalicu te je otpuštanje u želučanoj fazi nastavljeno kroz 120 min. Uzorkovanje je provedeno u određenim vremenskim intervalima na isti način kao i kod oralne faze, 2 mL uzorka se odvojilo, a isti volumen SGF otopine vraćan je u sustav. Po završetku želučane faze, kako bi se pokrenula crijevna faza, dodano je 16 mL SIF otopine, 40 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, pH je podešen na 7 te je dodana redestilirana voda kako bi ukupni volumen iznosio 40 mL. Crijevna faza trajala je 120 min, a uzorkovanje je provedeno na isti način kao i kod želučane faze.

U uzorcima odvojenima tijekom svake faze određena je koncentracija ukupnih fenolnih spojeva te antioksidacijska aktivnost.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje ukupnih fenolnih tvari

Ukupni fenolni spojevi određeni su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteuovom metodom koja pripada skupini kolorimetrijskih metoda. Princip metode temelji se na oksidaciji fenolnih spojeva u prisustvu Folin-Ciocalteu reagensa prilikom čega nastaje plavo obojeni kompleks čija se apsorbancija može izmjeriti spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm (Waterhouse, 2001).

Postupak

U epruvetu je otpipetirano 40 μL uzorka, 3160 μL destilirane vode i 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj epruvete je promiješan na vorteksu te je nakon 8 min dodano 600 μL 20%-tne otopine Na_2CO_3 . Uzorci su promiješani i inkubirani u vodenoj kupelji 30 min na 40 °C.

Slijepa proba pripremljena je na isti način, no umjesto uzorka dodavao se jednaki volumen destilirane vode. Nakon inkubacije, apsorbancija uzorka mjerena je na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Japan) na 765 nm. Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja.

Kalibracijska krivulja napravljena je prema istom postupku koristeći otopine galne kiseline u rasponu koncentracija od 0,05 do 1,0 mg/mL. Prema izmjerenim apsorbancijama za pripadajuće koncentracije pripremljene galne kiseline metodom linearne regresije, dobivena je funkcionalna ovisnost koncentracije fenolnih spojeva o apsorbanciji odnosno jednažba pravca (5) prema kojoj je računata koncentracija ukupnih fenolnih spojeva:

$$C = 1,0188 \cdot A + 0,018 \quad (5)$$

gdje je C – koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (mg/mL), a A – izmjerena apsorbancija uzorka pri valnoj duljini 765 nm. Konačne koncentracije fenolnih spojeva (UF) izražene su na masu liofiliziranog uzorka ($\text{mg}_{\text{UF}}/\text{g}_{\text{uz}}$).

3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

ABTS metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti uzorka temelji se na redukciji ABTS radikalskih kationa ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) što uzrokuje promjenu boje koja se može mjeriti spektrofotometrijski na valnoj duljini od 734 nm (Re i sur., 1999).

Priprema reagensa

Prije provedbe analize pripremljene su slijedeće otopine:

- 7 mM 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS) – 96,02 mg ABTS-a otopljeno u 25 mL destilirane vode,
- 2,45 mM amonij persulfat – 13,98 mg amonij persulfata otopljeno u 25 mL destilirane vode,
- 5 mM PBS pufer (engl. *Phosphate-buffered saline*) – u 300 mL destilirane vode otopljeno 1,8 g Na_2HPO_4 ; 0,33 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$ i 12,75 g NaCl.

Miješanjem 2,45 mM amonij persulfata i 7 mM ABTS-a u omjeru 1:1 pripremljen je $\text{ABTS}^{\bullet+}$ te je smjesa inkubirana na tamnom mjestu minimalno 16 h. Na dan analize pripremljena je svježja razrijeđena otopina $\text{ABTS}^{\bullet+}$ na način da je 1 mL $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pomiješan sa 40 mL PBS pufera. Razrijeđen radikalski kation miješao se na magnetnoj miješalici u tamnom te je

njegova apsorbanacija podešena na $0,706 \pm 0,02$ na valnoj duljini 743 nm. Ovako pripremljena otopina ABTS^{•+} se koristi za daljnje analize.

Postupak

U 50 μ L uzorka doda se 950 μ L razrijeđenog ABTS^{•+}, smjesa se kratko promiješa te inkubira u tamnom 10 min. Kontrolni uzorak je pripremljen na isti način, ali se umjesto uzorka dodao isti volumen PBS pufera. Nakon inkubacije izmjerene su apsorbanacije uzoraka u odnosu na slijepu probu (PBS pufer) na 734 nm. Sva mjerenja provedena su u tri paralele. Inhibicija ABTS^{•+} izračunata je prema izrazu (6):

$$\% \text{ inhibicije ABTS } \bullet^+ = \left(\frac{A_K - A_{UZ}}{A_K} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

gdje je: A_K – apsorbanacija kontrolnog uzorka i A_{UZ} – apsorbanacija uzorka.

Kalibracijska krivulja izrađena je prema istom postupku koristeći Trolox kao standard. Linearnom regresijom dobivena je jednadžba pravca (7) prema kojoj je izračunata antioksidacijska aktivnost izražena u gramima Troloxa po litri (g_{TROLOX}/L):

$$C = 0,0013 \cdot \% \text{ inhibicije ABTS } \bullet^+ + 0,0022 \quad (7)$$

Konačne vrijednosti za antioksidacijsku aktivnost izražene su na masu liofiliziranog uzorka ($mg_{\text{TROLOX}}/g_{\text{UZ}}$).

3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda se temelji na redukciji Fe³⁺ iona u Fe²⁺ ion u prisutnosti antioksidansa. Nastali Fe²⁺ ion u prisutnosti 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) formira intenzivno plavo obojeni kompleks koji ima apsorpcijski maksimum pri 592 nm. Brzina te reakcije ovisi o redukcijskoj snazi i koncentraciji dodanog antioksidansa (Jolić, 2017).

Priprema reagensa

Prije provedbe analize pripremljene su slijedeće otopine:

- 300 mM acetatni pufer – u 500 mL destilirane vode otopi se 3,1 g natrij acetata i pomiješa se 16 mL ledene octene kiseline te se otopina prenese u odmjernu tikvicu volumena 1 L i nadopuni destiliranom vodom do oznake,

- 40 mM HCl – u 250 mL destilirane vode doda se 3,285 mL 37%-tne HCl te se prenese u odmjernu tikvicu volumena 1 L i nadopuni destiliranom vodom do oznake,
- 10 mM TPTZ – 159,4 mg TPTZ-a otopi se u 50 mL 40 mM HCl,
- 20 mM FeCl₃(H₂O)₆ – 551,6 mg FeCl₃(H₂O)₆ otopi se u 100 mL destilirane vode.

Nakon pripreme otopina, pripremljen je FRAP reagens miješanjem 25 mL acetatnog pufera (prethodno zagrijanog na 37 °C), zatim 2,5 mL otopine TPTZ reagensa te 2,5 mL FeCl₃(H₂O)₆ otopine. Pripremljen FRAP reagens dalje se koristi za analizu.

Postupak

U epruvete je otpipetirano 270 µL destilirane vode i 150 µL uzorka, a potom dodano 2,7 mL FRAP reagensa. Uzorci su promiješani na vorteksu i inkubirani u tamnom mjestu 40 min na 37 °C. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane vode. Nakon inkubacije, očitana je apsorbancija na valnoj duljini 592 nm. Sva mjerenja napravljena su u dva ponavljanja.

Kalibracijska krivulja izrađena je prema istom postupku, ali kao uzorak korištena je vodena otopina FeSO₄(H₂O)₇ pripremljena u rasponu koncentracija od 100 do 1000 µmol/L. Kako bi se dobiveni rezultati mogli usporediti sa ABTS metodom određivanja antioksidacijske aktivnosti, kalibracijska krivulja preračunata je na ekvivalente Troloxa te je dobiven izraz (8):

$$C = 0,2335 \cdot A + 0,0029 \quad (8)$$

gdje je C – koncentracija Troloxa ($\text{g}_{\text{TROLOX}}/\text{L}$) te A – izmjerena apsorbancija uzorka. Konačne vrijednosti za antioksidacijsku aktivnost izražene su na masu liofiliziranog uzorka ($\text{mg}_{\text{TROLOX}}/\text{g}_{\text{uz}}$).

3.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Za opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva korišteni su matematički modeli opisani u poglavlju **2.4. Matematičko modeliranje otpuštanja fenolnih spojeva** pri čemu je korišten program DD solver.

4. REZULTATI I RASPRAVA

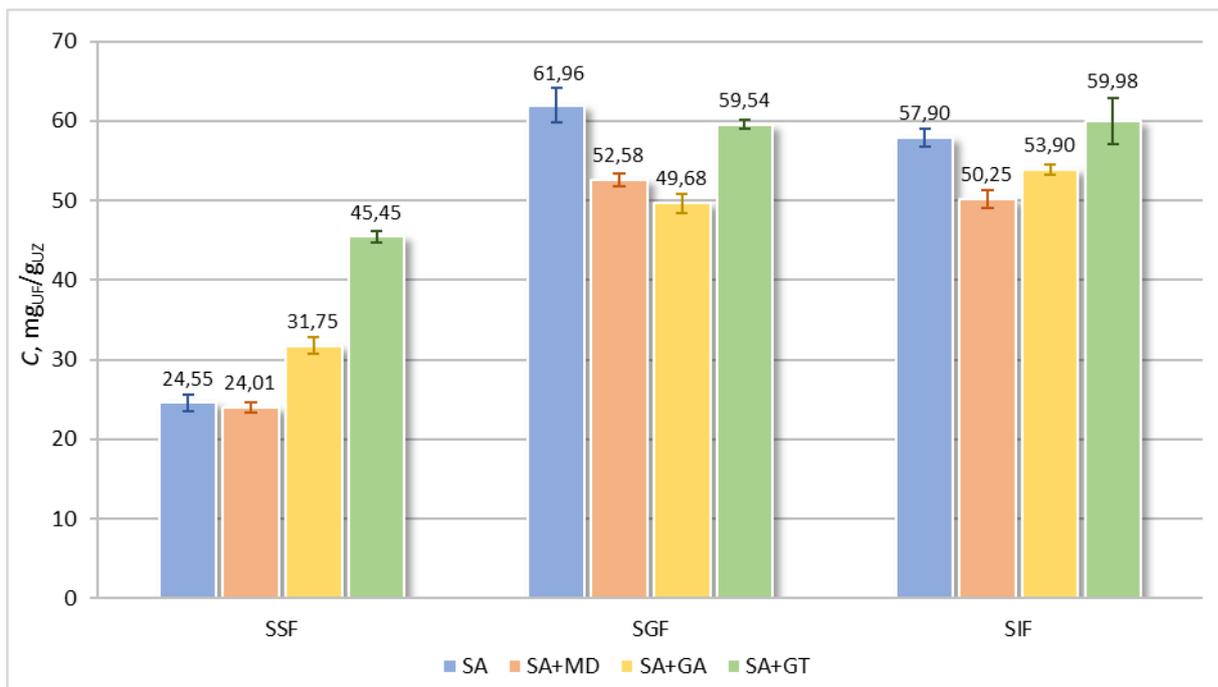
Dobiveni rezultati prilikom izrade ovog rada prikazani su u tablicama i dijagramima.

4.1. ISPITIVANJE *IN VITRO* OTPUŠTANJA INKAPSULIRANIH FENOLNIH SPOJEVA

Inkapsulacija ekstrakta tropa grožđa provedena je s ciljem praćenja otpuštnja fenolnih spojeva iz inkapsulata tijekom probave. Naime, prilikom probave hrane bogate fenolnim spojevima, oni se većinom razgrade u želudcu s obzirom na njihovu osjetljivost pri niskim pH vrijednostima, a kako bi se iskoristili njihovi pozitivni učinci na tijelo potrebno je da se isporuče na ciljano mjesto u organizmu gdje se mogu apsorbirati odnosno u crijeva. Inkapsulacijom se nastoje zaštititi fenolni spojevi i osigurati njihova ciljana dostava u crijeva. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj različitih omotača korištenih za inkapsulaciju ekstrakta tropa grožđa na otpuštanje fenolnih spojeva u u gastrointestinalnom sustavu u *in vitro* uvjetima.

Otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsuliranog ekstrakta tropa grožđa provedeno je u tri faze – oralna, želučana i crijevna faza. Svaku od ovih faza simulirala je određena otopina elektrolita te prikladna pH vrijednost, a otpuštanje fenolnih spojeva praćeno je kroz 423 minute. Točnije, oralna faza je trajala 3 minute, dok su želučana i crijevna faza svaka trajale 120 minuta. Tijekom otpuštanja, u određenim vremenskim intervalima provedeno je uzorkovanje kako bi se utvrdilo na koji način te u kojim koncentracijama se otpuštaju fenolni spojevi iz inkapsulata. Prema dobivenim rezultatima prikazanim na **Slici 6**, može se vidjeti da izbor omotača utječe na otpuštanje inkapsuliranih fenolnih spojeva.

Uspoređivanjem *in vitro* otpuštanja fenolnih spojeva u različitim fazama, može se uočiti da je iz pojedinog inkapsulata, najmanji udio fenolnih spojeva otpušten u oralnoj fazi, odnosno tijekom prve 3 minute. Ekstrakt inkapsuliran pomoću SA i SA+MD pokazao je slično otpuštanje fenolnih spojeva, dok su se fenolni spojevi inkapsulirani kombinacijom SA+GA i SA+GT otpuštali u većim koncentracijama. Najveće otpuštanje vidljivo je iz SA+GT inkapsulata u koncentraciji 45,45 mg_{UF}/g_{UZ} (**Slika 6**).



Slika 6 Udio otpuštenih ukupnih fenolnih spojeva (UF) na završetku oralne faze (SSF), želučane faze (SGF) i crijevne faze (SIF) za ekstrakt inkapsuliran korištenjem natrij alginata (SA), kombinacije natrij alginata i maltodekstrina (SA+MD), natrij alginata i gume arabike (SA+GA) te natrij alginata i gume tragacanth (SA+GT) kao omotača

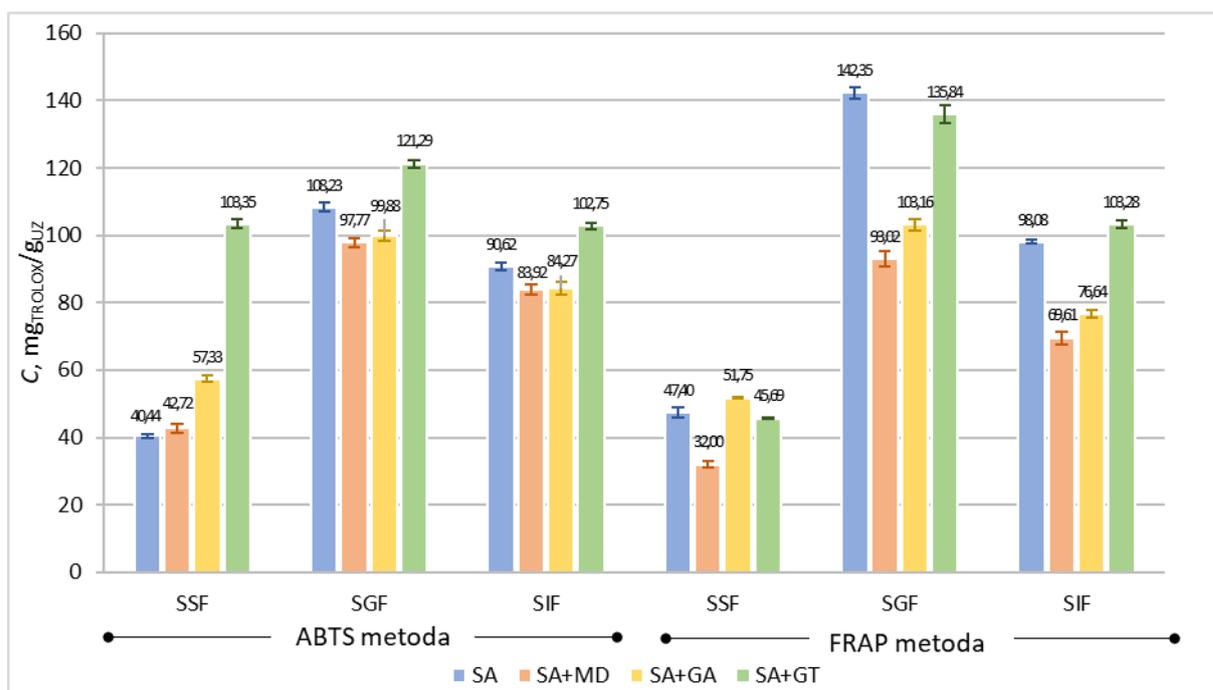
Prelaskom iz oralne u želučanu fazu, pH sustava se mijenja sa 7 na 3. Promjena pH vrijednosti iz lužnatog u kiselo uzrokovala je promjenu boje otopine u intenzivnu ružičastu boju. Ova promjena događa se zbog antocijana prisutnih u ekstraktu tropa grožđa koji su izrazito osjetljivi na promjene pH vrijednosti. Odabir omotača za inkapsulaciju iznimno je bitan upravo radi želučane faze. Omotač bi trebao očuvati fenolne spojeve tijekom želučane faze kako bi bili u mogućnosti otpustiti se u crijevnoj fazi. Prema dobivenim rezultatima u želučanoj fazi se otpustilo najviše inkapsuliranih fenolnih spojeva iz dva uzorka – SA (61,96 mg_{UF}/g_{UZ}) te SA+GT (59,54 mg_{UF}/g_{UZ}) (**Slika 6**).

Iz **Slike 6** može se uočiti da je koncentracija otpuštenih fenolnih spojeva iz ekstrakta inkapsuliranog sa SA i SA+MD manja na kraju crijevne faze u usporedbi sa želučanom fazom, što nije slučaj i sa uzorcima SA+GA i SA+GT čija je koncentracija veća na kraju crijevne faze. U crijevnoj fazi, najveći udio fenolnih spojeva otpušten je iz SA+GT inkapsulata u koncentraciji 59,98 mg_{UF}/g_{UZ}. Metodom liofilizacije i maltodekstrinom kao omotačem, Ahmadian i sur. (2019) proveli su inkapsulaciju fenolnog ekstrakta latica šafrana, a Dadi i sur. (2020) ekstrakta listova afričke moringe (*Moringa stenopetala*) te su nakon provedbe *in vitro*

otpuštanja primjetili veće otpuštanje fenolnih spojeva u želučanoj fazi nego u crijevnoj. Nadalje, kod Dadi i sur. (2020) primjećeno je veće otpuštanje na kraju obje faze u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom radu. S obzirom na to može se zaključiti da je dodatak natrij alginata maltodekstrinu igrao ulogu u sporijem otpuštanju fenolnih spojeva. Također, upotreba guma kao dodatnih omotača koji se inkapsuliraju radi kontroliranog otpuštanja je od velikog interesa radi toga što gume posjeduju dobru stabilnost pri različitim temperaturama i pH vrijednostima (Taheri i Jafari, 2019).

4.2. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI TIJEKOM *IN VITRO* OTPUŠTANJA INKAPSULIRANIH FENOLNIH SPOJEVA

Nakon ispitivanja otpuštanja fenolnih spojeva, analizirana je i antioksidacijska aktivnost, nakon svake faze, pomoću dvije metode ABTS i FRAP. Prema prikazanim rezultatima (**Slika 7**) može se uočiti da je najniža antioksidacijska aktivnost zabilježena nakon oralne faze u svim uzorcima te u obje korištene metode.



Slika 7 Antioksidacijska aktivnost alikvota izmjerena prema ABTS i FRAP metodama na kraju oralne (SSF), želučane (SGF) i crijevne faze (SIF) za ekstrakt inkapsuliran pomoću natrij alginata (SA), kombinacije SA i maltodekstrina (MD), SA i gume arabike (GA) te SA i gume tragacanth (GT)

Najveća razlika u antioksidacijskoj aktivnosti mjerenoj prema dvije metode vidljiva je kod uzorka SA+GT (**Slika 7**). Na kraju oralne faze ABTS metodom zabilježena je antioksidacijska

aktivnost u vrijednosti 103,35 mg_{TROLOX/gUZ}, dok je za isti uzorak FRAP metodom izmjerena vrijednost iznosila 45,69 mg_{TROLOX/gUZ}. Nadalje, ako se pogledaju podaci za želučanu fazu također su vidljive velike razlike u antioksidacijskoj aktivnosti pogotovo za uzorak SA. Naime, FRAP metodom antioksidacijska aktivnost na kraju želučane faze za ekstrakt inkapsuliran natrij alginatom (SA) iznosila je 142,35 mg_{TROLOX/gUZ}, što je ujedno i najveća vrijednost izmjerena za sve tri faze otpuštanja. Za isti uzorak, ABTS metodom izmjerena antioksidacijska aktivnost iznosila je 108,23 mg_{TROLOX/gUZ} (**Slika 7**). Uspoređujući metode, u želučanoj fazi, FRAP metodom izmjerene su najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti osim za SA+MD čija je najveća antioksidacijska aktivnost također izmjerena u želučanoj fazi, ali pomoću ABTS metode (97,77 mg_{TROLOX/gUZ}). Antioksidacijska aktivnost svih uzorka u obje metode, osim za SA+GT slijedi isti trend, najmanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti su u oralnoj fazi, zatim dosežu vrhunac u želučanoj fazi te opadaju u crijevnoj fazi (**Slika 7**). Kod inkapsulata SA+GT primjenom ABTS metode, najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzorka zabilježena je po završetku crijevne faze (102,75 mg_{TROLOX/gUZ}) (**Slika 7**). Nadalje, izračunata je jaka pozitivna korelacija ($R= 0,85-0,91$) između antioksidacijske aktivnosti određene objema metodama i koncentracije ukupnih fenolnih spojeva što potvrđuje da su iz inkapsuliranog ekstrakta fenolni spojevi glavni nosioci antioksidacijske aktivnosti.

Razlike u vrijednostima dobivene antioksidacijske aktivnosti mjerene pomoću dviju metoda vidljive su iz razloga što je mehanizam djelovanja ABTS-a i FRAP-a različit. ABTS analiza temelji se na mehanizmu reakcije prijenosa jednog elektrona koji mjeri oslobađanje elektrona, pretvarajući ga u anion (Platzer i sur., 2021). Nasuprot tome, FRAP metodom izravno se mjeri redukcijski kapacitet, odnosno redukcijska snaga antioksidansa koja je povezana s konjugacijom fenola i brojem hidroksilnih skupina u strukturi fenola (Aadil i sur., 2014).

4.3. KINETIKA OTPUŠTANJA FENOLNIH SPOJEVA

In vitro otpuštanje inkapsuliranih fenolnih spojeva opisano je pomoću četiri matematička modela: modela prvog reda, Higuchi modela, Korssmeyer-Peppas modela te Hixson-Crowell modela. Prema dobivenim podacima, odabran je jedan model za svaki uzorak koji najbolje opisuje otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsulata prema tri statistička kriterija koji se uobičajeno koriste za procjenu uspješnosti aproksimacije modelom:

1. R^2_{adj} – prilagođeni koeficijent determinacije,
2. AIC – Akaike informacijski kriterij i
3. MSC – kriterij odabira modela.

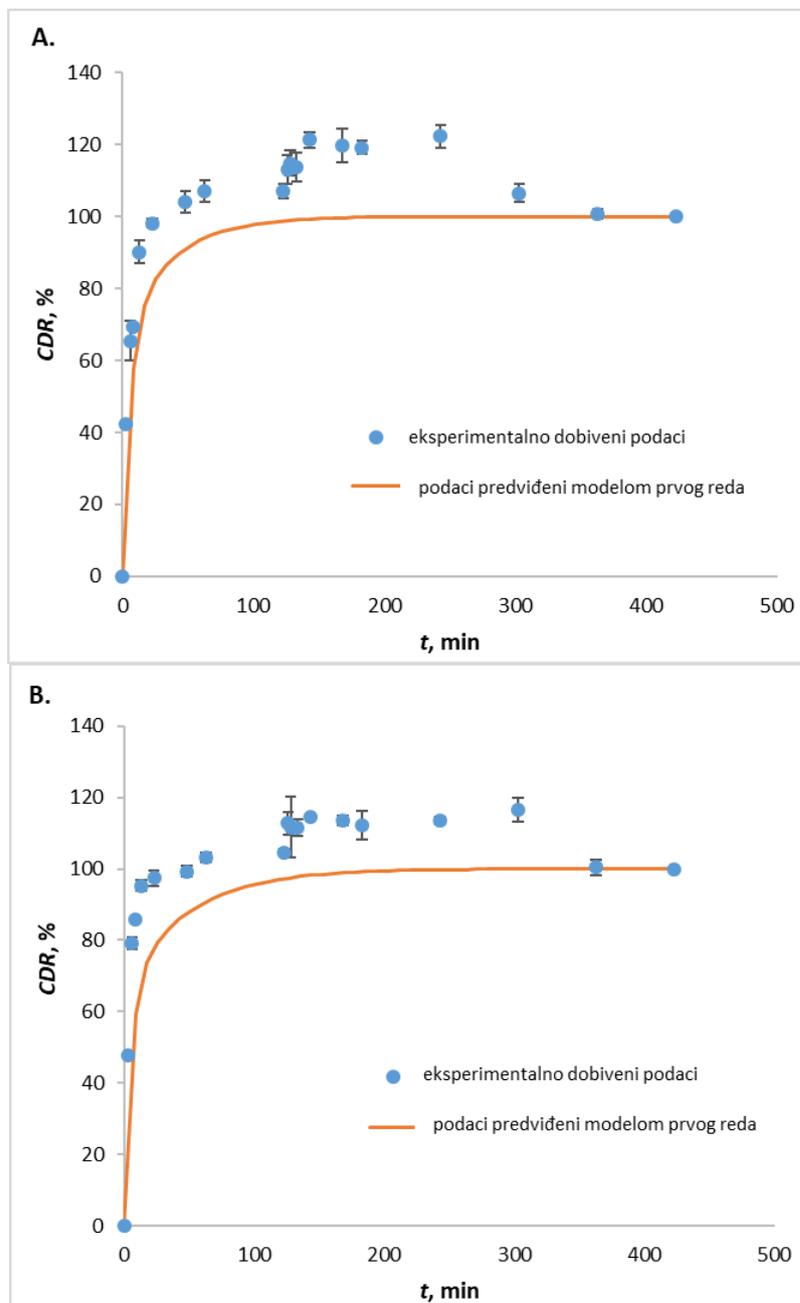
Ekstrakt inkapsuliran pomoću natrij alginata (SA) te kombinacije natrij alginata i maltodekstrina (SA+MD) pokazao je otpuštanje fenolnih spojeva prema istom modelu – modelu prvog reda. Dobiveni parametri prikazani su u **Tablici 4**.

Tablica 4 Procijenjeni parametri primijenjenih matematičkih modela za opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsuliranog ekstrakta tropa grožđa (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} — konstante otpuštanja za odgovarajući model; n —difuzijski eksponent) te statistički kriteriji za uspjeh aproksimacije modela (R^2_{adj} — prilagođeni koeficijent determinacije, AIC— Akaike informacijski kriterij, MSC— kriterij odabira modela)

Matematički model		SA	SA+MD
Model prvog reda	R^2_{adj}	0,86 ± 0,03	0,87 ± 0,01
	AIC	150,52 ± 3,77	146,16 ± 0,30
	MSC	1,15 ± 0,30	0,91 ± 0,06
	k_1	0,17 ± 0,03	0,21 ± 0,06
Higuchi model	R^2_{adj}	-0,56 ± 0,12	-1,04 ± 0,04
	AIC	196,29 ± 1,62	197,72 ± 0,46
	MSC	-1,28 ± 0,11	-1,81 ± 0,04
	k_H	8,09 ± 0,09	7,98 ± 0,08
Hixson–Crowell model	R^2_{adj}	-0,82 ± 0,14	-1,39 ± 0,08
	AIC	199,16 ± 1,64	200,70 ± 0,90
	MSC	-1,43 ± 0,11	-1,97 ± 0,04
	k_{HC}	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00
Korsmeyer–Peppas model	R^2_{adj}	-	-
	AIC	-	-
	MSC	-	-
	k_{KP}	-	-
	n	-	-

Prema ovom modelu, koncentracija fenolnih spojeva opada u inkapsulatu tijekom procesa zbog otpuštanja kroz porozni materijal. Budući da se pretpostavlja da je takvo otpuštanje linearno, u ovoj hipotezi mogu postojati neke razlike između ekperimentalnih podataka i podataka izračunatim primjenjenim modelom (pune krivulje). Prema rezultatima može se vidjeti da se stvarno, odnosno opaženo otpuštanje razlikuje od kinetike otpuštanja pretpostavljenog modelom (**Slika 8**). Prije kraja otpuštanja uočeno je kumulativno otpuštanje preko 100% do čega može doći zbog povećane topljivosti inkapsulata u probavnim otopinama (Bhatt i sur., 2020). Također, prevelike količine uzorka i korištenje uvjeta

potonuća (omogućavanje potpunog uranjanja uzorka u tekućinu) mogu povećati brzinu otapanja i uzrokovati ovakve rezultate (Liu i sur., 2013). Inkapsulati pripremljeni sa natrij alginatom (SA), maksimalno otpuštanje fenolnih spojeva pokazali su do 243. minute *in vitro* otpuštanja, nakon čega slijedi pad koncentracije fenolnih spojeva povezan s smanjenim otpuštanjem istih (**Slika 8A**). Korištenjem natrij alginata u kombinaciji sa maltodekstrinom (SA+MD), najveće kumulativno otpuštanje vidljivo je u 303. minuti (**Slika 8B**).



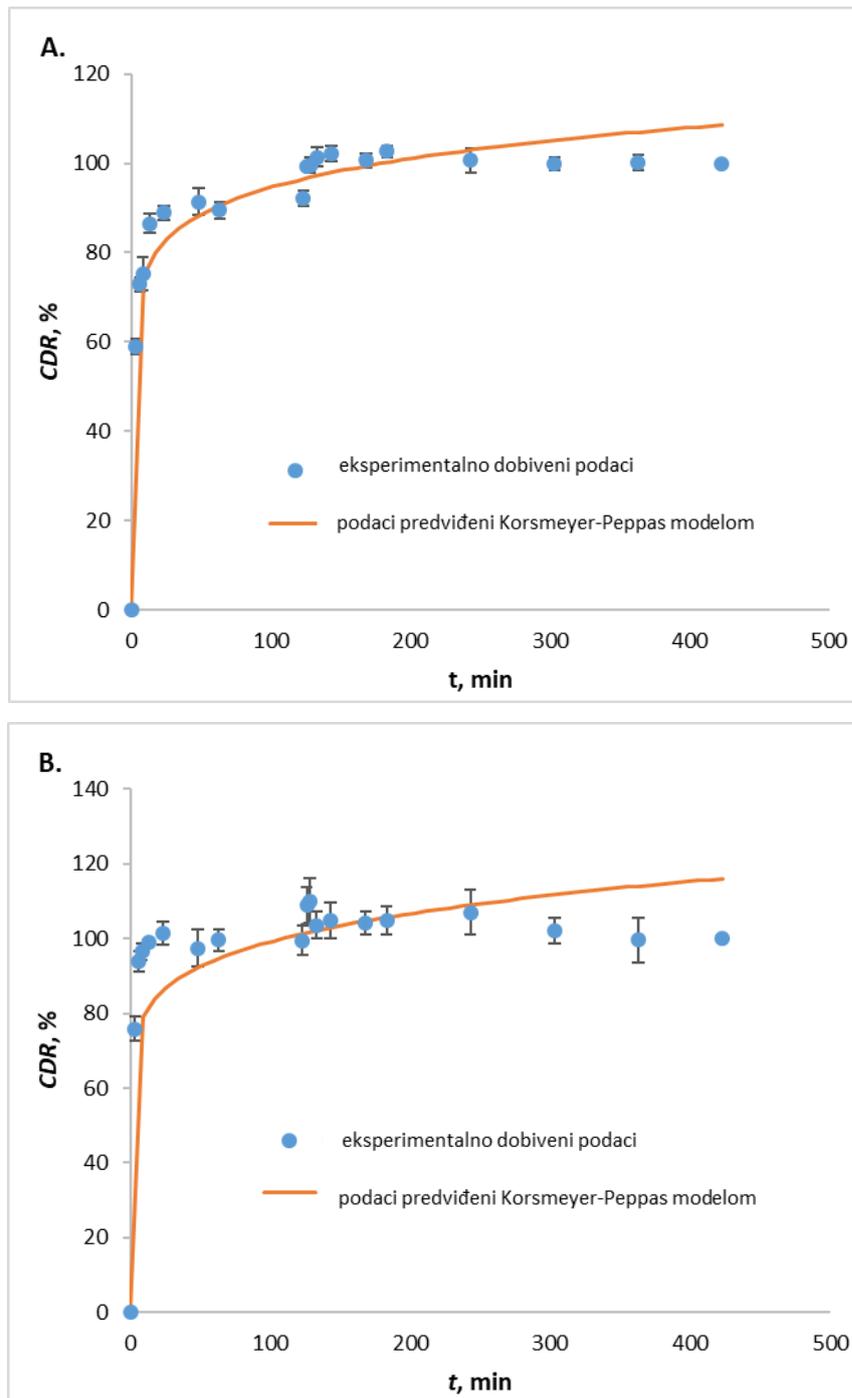
Slika 8 Grafički prikaz kinetike kumulativnog otpuštanja fenolnih spojeva (CDR , %) prema modelu prvog reda u ovisnosti o vremenu (t , min) iz inkapsulata sa natrij alginatom (**A**) te inkapsulata sa natrij alginatom i maltodekstrinom (**B**)

Tijekom *in vitro* otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsulata gdje su omotači bili kombinacija natrij alginata i gume tragacanth (SA+GT) te natrij alginata i gume arabike (SA+GA), matematičkim modeliranjem došlo se do zaključka da se kinetika otpuštanja fenolnih spojeva ponaša prema Korsmeyer-Peppas modelu. Dobiveni parametri prikazani su u **Tablici 5**.

Tablica 5 Procijenjeni parametri primijenjenih matematičkih modela za opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsuliranog ekstrakta tropa grožđa (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} — konstante otpuštanja za odgovarajući model; n —difuzijski eksponent) te statistički kriteriji za uspjeh aproksimacije modela (R^2_{adj} — prilagođeni koeficijent determinacije, AIC— Akaike informacijski kriterij, MSC— kriterij odabira modela)

Matematički model		SA+GA	SA+GT
Model prvog reda	R^2_{adj}	-0,14 ± 0,32	-0,70 ± 1,40
	AIC	180,13 ± 5,42	174,74 ± 34,61
	MSC	-1,47 ± 0,36	-1,88 ± 1,92
	k_1	0,04 ± 0,01	0,17 ± 0,24
Higuchi model	R^2_{adj}	-1,22 ± 0,11	-2,43 ± 0,10
	AIC	193,30 ± 0,67	201,47 ± 1,19
	MSC	-2,17 ± 0,10	-3,28 ± 0,06
	k_H	7,28 ± 0,04	7,65 ± 0,26
Hixson–Crowell model	R^2_{adj}	-1,60 ± 0,05	-2,86 ± 0,12
	AIC	196,35 ± 0,33	203,70 ± 1,82
	MSC	-2,33 ± 0,07	-3,40 ± 0,04
	k_{HC}	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00
Korsmeyer–Peppas model	R^2_{adj}	0,95 ± 0,00	0,94 ± 0,01
	AIC	121,31 ± 1,30	124,95 ± 2,58
	MSC	1,62 ± 0,04	0,69 ± 0,17
	k_{KP}	60,99 ± 1,57	83,66 ± 0,68
	n	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,00

Parametar n je eksponent otpuštanja koji ukazuje na mehanizam prijenosa nekog bioaktivnog spoja kroz polimer. Vrijednost n koristi se za karakterizaciju različitih mehanizama otpuštanja pa tako ukoliko je $n < 0,5$ ukazuje na kvazi-Fickovu difuziju bioaktivnog spoja kroz sustav (inkapsulat) koji nema sposobnost bubrenja. **Slika 9** prikazuje grafički prikaz Korsmeyer-Peppas modela za eksperimentalne i modelom izračunate vrijednosti kumulativnog otpuštanja fenolnih spojeva iz uzoraka. U 183. minuti otpuštanja fenolnih spojeva iz ekstrakta inkapsuliranog sa natrij alginatom i gumom arabikom, maksimalno kumulativno otpuštanje je primjećeno te je vidljiv blagi pad sve do kraja otpuštanja (**Slika 9A**). Ekstrakt inkapsuliran sa natrij alginatom i gumom tragacanth već je u 128. minuti pokazao najveće kumulativno otpuštanje, a zatim pad vrijednosti (**Slika 9B**).



Slika 9 Grafički prikaz kinetike kumulativnog otpuštanja fenolnih spojeva (*CDR*, %) prema Korsmeyer-Peppas modelu u ovisnosti o vremenu (*t*, min) iz inkapsulata sa natrij alginatom i gumom arabikom (**A**) te inkapsulata sa natrij alginatom i gumom tragacanth (**B**)

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi provedenog istraživanja mogu se donijeti slijedeći zaključci:

- Provedbom *in vitro* otpuštanja utvrđeno je da izbor omotača utječe na otpuštanje inkapsuliranih fenolnih spojeva tijekom tri faze – oralne, želučane i crijevne.
- Najveće otpuštanje fenolnih spojeva ostvareno je iz SA+GT inkapsulata u oralnoj (45,45 mg_{UF}/g_{UZ}) i crijevnoj fazi (59,98 mg_{UF}/g_{UZ}) dok je u želučanoj fazi otpušteno najviše fenolnih spojeva iz SA inkapsulata (61,96 mg_{UF}/g_{UZ}).
- Ispitivanjem antioksidacijske aktivnosti tijekom *in vitro* otpuštanja pomoću ABTS i FRAP metode, uočeno je da uzorci slijede isti trend – najmanje vrijednosti su zabilježene u oralnoj fazi, dosežu vrhunac u želučanoj i padaju u crijevnoj fazi. Mjerenjem antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom utvrđeno je da otpuštanje iz SA+GT inkapsulata ne slijedi isti trend kao ostali uzorci te je najniža vrijednost koncentracije fenolnih spojeva zabilježena je po završetku crijevne faze (102,75 mg_{TROLOX}/g_{UZ}).
- Utvrđena je jaka pozitivna korelacija ($R = 0,85 - 0,91$) između antioksidacijske aktivnosti i koncentracije otpuštenih ukupnih fenolnih spojeva.
- Za opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz ekstrakta inkapsuliranog sa SA i SA+MD kao najprikladniji model se pokazao model prvog reda, dok je kinetiku otpuštanja iz SA+GA i SA+GT inkapsulata najbolje opisivao Korsmeyer-Peppas model.

6. LITERATURA

- Aadil KR, Barapatre A, Sahu S, Jha H, Tiwary BN: Free radical scavenging activity and reducing power of *Acacia nilotica* wood lignin. *International Journal of Biological Macromolecules* 67:220-227, 2014.
- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO: Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* 152:46-55, 2014.
- Ahmadian Z, Niazmand R, Pourfarzad A: Microencapsulation of saffron petal phenolic extract: their characterization, *in vitro* gastrointestinal digestion, and storage stability. *Journal of Food Science* 84:2745-2757, 2019.
- Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR: Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology* 31:227-249, 2011.
- Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI: Extraction of phenolic compounds: a review. *Current Research in Food Science* 4:200-214, 2021.
- Arenas EH, Trinidad TP: Fate of polyphenols in pili (*Canarium ovatum* Engl.) pomace after *in vitro* simulated digestion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7:53-58, 2017.
- Arifin DY, Lee LY, Wang C-H: Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58:1274-1325, 2006.
- Arnous A, Meyer AS: Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:3911-3619, 2009.
- Assadpour E, Jafari S-M, Maghsoudlou Y: Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. *International Journal of Biological Macromolecules* 95:238-247, 2017.
- Barros A, Gironés-Vilaplana A, Texeira A, Baenas N, Domínguez-Perles R: Grape stems as a source of bioactive compounds: application towards added-value commodities and significance for human health. *Phytochemistry Review* 14:921-931, 2015.
- Beirão-da-Costa S, Duarte C, Bourbon AI, Pinheiro AC, Januário MIN, Vicente AA, Beirão-da-Costa ML, Delgadillo I: Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of *Oregano* essential oil. *Food Hydrocolloids* 33:199-206, 2013.
- Bertagnolli C, Espindola AP, Kleinübing SJ, Tasic L, da Silva MG: *Sargassum filipendula* alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate Polymers* 111:619-623, 2014.
- Bhatt S, Roy D, Kumar M, Saharan R, Malik A, Saini V: Development and validation of *in vitro* discriminatory dissolution testing method for fast dispersible tablets of BCS class II drug. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences* 17:74-80, 2020.

- Bohn T: Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews* 72:429-452, 2014.
- Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M: Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity - a review. *International Journal of Food Science & Technology* 54:933-942, 2019.
- Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, Bohn T, Bourlieu-Lacanal C, Boutrou R, Carrière F, Clemente A, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Edwards C, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie AR, Martins C, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Minekus M, Portmann R, Santos CN, Souchon I, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Recio I: INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 14:991-1014, 2019.
- Bruschi ML: *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*. Woodhead Publishing, Sawston, UK, 2015.
- Bucić-Kojić A, Fernandes F, Silva T, Planinić M, Tišma M, Šelo G, Šibalić D, Pereira DM, Andrade PB: Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. *Food & Function* 11:680-688, 2020.
- Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A: Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13:155-171, 2014.
- Ceballos AM, Giraldo GI, Orrego CE: Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering* 111:360-365, 2012.
- Chitchumroonchokchai C, Riedl KM, Suksumrarn S, Clinton SK, Kinghorn AD, Failla ML: Xanthenes in mangosteen juice are absorbed and partially conjugated by healthy adults. *The Journal of Nutrition* 142:675-680, 2012.
- Costa P, Lobo JM: Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13:123-133, 2001.
- Dadi DW, Emire SA, Hagos AD, Eun J-B: Physical and functional properties, digestibility, and storage stability of spray- and freeze-dried microencapsulated bioactive products from moringa stenopetala leaves extract. *Industrial Crops and Products* 156:112891, 2020.
- Desai KG, Jin Park H: Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23:1361-1394, 2005.
- Dwyer K, Hosseinian F, Rod M: The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research* 3:91, 2014.

- Eghbal N, Choudhary R: Complex coacervation: encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *Food Science and Technology* 90:254-264, 2018.
- El Gharras H: Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science & Technology* 44:2512–2518, 2009.
- El Khawand T, Courtois A, Valls J, Richard T, Krisa S: A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews* 17:1007-1029, 2018.
- Fontana AR, Antoniolli A, Bottini R: Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:8987-9003, 2013.
- Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J: Phenolic acids. U *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, str. 1951-1973. Springer, Berlin, Njemačka, 2013.
- Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A: Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants* 9:923, 2020.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M: Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* 30:591-600, 2012.
- Hecht H, Srebnik S: Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. *Biomacromolecules* 17:2160-2167, 2016.
- Higuchi T: Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50:874-875, 1961.
- Higuchi WI: Analysis of data on the medicament release from ointments. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 51:802-804, 1962.
- Higuchi T: Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52:1145-1149, 1963.
- Hixson AW, Crowell JH: Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial & Engineering Chemistry* 23:923-931, 1931.
- Imeson AP: Exudate gums. U *Thickening and gelling agents for food*, str. 66-97. Springer Science & Business Media, London, UK, 1992.
- Jafari SM, Esfanjani AF, Katouzian I, Assadpour E: Release, characterization, and safety of nanoencapsulated food ingredients. U *Nanoencapsulation of food bioactive ingredients principles and applications*, str. 401-453. Academic Press, London, UK, 2017.
- Jolić N: Antioksidacijska aktivnost fenola: interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline. *Završni rad*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2017.

- Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A: Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4360-4367, 2004.
- Katalinić V, Možina SS, Skroza D, Generalić I, Abramovič H, Miloš M, Ljubenković I, Piskernik S, Pezo I, Terpić P, Boban M: Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* 119:715-723, 2010.
- Khajouei RA, Keramat J, Hamdami N, Ursu A-V, Delattre C, Laroche C, Gardarin C, Lecerf D, Desbrières J, Djelveh G, Michaud P: Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed *Nizimuddinia zanardini*. *International Journal of Biological Macromolecules* 118:1073-1081, 2018.
- Ko S, Gunasekaran S: Controlled release of food ingredients. U *Nano- and microencapsulation for foods*, str. 327-343. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2014.
- Kong F, Singh RP: Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science* 73:67-80, 2008.
- Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA: Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 15:25-35, 1983.
- Koyyada A, Orsu P: Natural gum polysaccharides as efficient tissue engineering and drug delivery biopolymers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 63:102431, 2021.
- Kunal AG, Mallinath H, Deepak B, Pallavi S: Lyophilization/freeze drying world. *Journal of Pharmaceutical Research* 4:516-543, 2015.
- Lao LL, Peppas NA, Boey FY, Venkatraman SS: Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 418:28-41, 2011.
- Larsen B, Salem DM, Sallam MA, Mishrikey MM, Beltagy AI: Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea coast. *Carbohydrate Research* 338:2325-2336, 2003.
- Lavelli V, Harsha PS, Spigno G: Modelling the stability of maltodextrin-encapsulated grape skin phenolics used as a new ingredient in apple puree. *Food Chemistry* 15:323-331, 2016.
- Leong KW, Langer R: Polymeric controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1:199-233, 1988.
- Liang L, Wu X, Zhao T, Zhao J, Li F, Zou Y, Mao G, Yang L: *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International* 46:76-82, 2012.

- Lingua MS, Wunderlin DA, Baroni MV: Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *Journal of Functional Foods* 44:86-94, 2018.
- Liu P, De Wulf O, Laru J, Heikkilä T, van Veen B, Kiesvaara J, Hirvonen J, Peltonen L, Laaksonen T: Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *The American Association of Pharmaceutical Scientists* 14:748-756, 2013.
- Lokhandwala H, Deshpande A, Deshpande S: Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: an overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4:728-773, 2013.
- Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S: Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 41:1-21, 2006.
- Malekjani N, Jafari SM: Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20:3-47, 2020.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 5:727-747, 2004.
- Manara P, Zabaniotou A, Vanderghem C, Richel A: Lignin extraction from Mediterranean agro-wastes: Impact of pretreatment conditions on lignin chemical structure and thermal degradation behavior. *Catalysis Today* 223:25-34, 2014.
- Manca D, Rovaglio M: Modeling the controlled release of microencapsulated drugs: theory and experimental validation. *Chemical Engineering Science* 58:1337-1351, 2003.
- Martinović J, Lukinac J, Jukić M, Ambrus R, Planinić R, Šelo G, Klarić A-M, Perković G, Bucić-Kojić A: Physicochemical characterization and evaluation of gastrointestinal in vitro behavior of alginate-based microbeads with encapsulated grape pomace extracts. *Pharmaceutics* 15:980, 2023.
- McClements DJ, Li Y: Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science* 159:213–228, 2010.
- Mishra M: *Handbook of encapsulation and controlled release*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD, 2016.
- Mourtzinou I, Goula A: Polyphenols in agricultural byproducts and food waste. U *Polyphenols in plants, isolation, purification and extract preparation*, str. 28-34. Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2019.
- Muangrat R, Ravichai K, Jirarattanarangsri W: Encapsulation of polyphenols from fermented wastewater of Miang processing by freeze drying using a maltodextrin/gum Arabic mixture as coating material. *Journal of Food Processing and Preservation* 43:e13908, 2019.

- Nejatian M, Abbasi S, Azarikia F: Gum tragacanth: structure, characteristics and applications in foods. *International Journal of Biological Macromolecules* 160:846-860, 2020.
- Nussinovitch A: *Plant gum exudates of the world: sources, distribution, properties, and applications*. CRC Press, Boca Raton, SAD, 2009.
- Ozidal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E: The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* 8:78, 2016.
- Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:270-278, 2009.
- Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, Calhelha RC, Barros L, Pinho SP, Ferreira ICFR: Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry* 253:132-138, 2018.
- Peng H, Li W, Li H, Deng Z, Zhang B: Extractable and non-extractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycinemax* (L.) merr). *Journal of Functional Foods* 32:296-312, 2017.
- Peppas NA, Narasimhan B: Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 190:75-81, 2014.
- Pikal MJ, Shah S, Roy ML, Putman R: The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutics* 60:203-207, 1990.
- Platzer M, Kiese S, Herfellner T, Schweiggert-Weisz U, Miesbauer O, Eisner P: Common trends and differences in antioxidant activity analysis of phenolic substances using single electron transfer based assays. *Molecules* 26:1244, 2021.
- Putnik P, Bursać Kovačević D, Ježek D, Šustić I, Zorić Z, Dragović-Uzelac V: High-pressure recovery of anthocyanins from grape skin pomace (*Vitis vinifera* cv. Teran) at moderate temperature. *Journal of Food Processing and Preservation* 42:e13342, 2018.
- Ray S, Raychaudhuri U, Chakraborty R: An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience* 13:76-86, 2016.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237, 1999.
- Rebello LPG, Lago-Vanzela ES, Barcia MT, Ramos AM, Stringheta PC, Da-Silva R, Castillo-Muñoz N, Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I: Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea × IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Food Research International* 54:354-366, 2013.

- Rezvankhah A, Emam-Djomeh Z, Askari G: Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology* 38:235-258, 2019.
- Ritger PL, Peppas NA: A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* 5:23-36, 1987a.
- Ritger PL, Peppas NA: A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* 5:37-42, 1987b.
- Robert P, García P, Reyes N, Chávez J, Santos J: Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry* 134:1-8, 2012.
- Sachan NK, Pushkar S, Jha A, Bhattacharya A: Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy Research* 8:1191-1199, 2009.
- Shahidi F, Ambigaipalan P: Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *Journal of Functional Foods* 18:820-897, 2015.
- Shahidi F, Han Xiao-Qing: Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33:501-547, 1993.
- Shahidi F, Peng H: Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives* 4:11-68, 2018.
- Shahidi F, Yeo J: Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules* 21:1216, 2016.
- Siepmann J, Peppas NA: Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:163-174, 2012.
- Siepmann J, Siepmann FJ: Mathematical modeling of drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics* 453:328-343, 2013.
- Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N: Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – a review. *Food Chemistry* 206:1-11, 2016.
- Simpson D, Amos S: Chapter 12 - Other plant metabolites. U *Pharmacognosy*, str. 267-280. Academic Press, Boston, SAD, 2017.
- Spigno G, Marinoni L, Garrido GD: State of the art in grape processing by-products. U *Handbook of grape processing by-products*, str. 1-27. Academic Press Elsevier, London, UK, 2017.

- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Martinović J, Perković G, Bucić-Kojić A: Bioconversion of grape pomace with *Rhizopus Oryzae* under solid-state conditions: Changes in the chemical composition and profile of phenolic compounds. *Microorganisms* 11:956, 2023.
- Taheri A, Jafari SM: Nanostructures of gums for encapsulation of food ingredients. U *Biopolymer nanostructures for food encapsulation purposes*, str. 521-578. Academic Press, London, UK, 2019.
- Taladrid D, Rebollo-Hernanz M, Martin-Cabrejas MA, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B: Grape pomace as a cardiometabolic health-promoting ingredient: activity in the intestinal environment. *Antioxidants* 12:979, 2023.
- Tang X, Pikal MJ: Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research* 21:191-200, 2004.
- Unusan N: Proanthocyanidins in grape seeds: an updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods* 67:103861, 2020.
- Valiente C, Arrigoni E, Esteban RM, Amado R: Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of Food Science* 60:818-820, 1995.
- Velderrain-Rodríguez GR, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala JF, Chen CO, Robles-Sánchez M, Astiazaran-García H, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA: Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & Function* 2:189-197, 2014.
- Waterhouse AL: Determination of total phenolics. U *Current protocols in food analytical chemistry*, str. I1.1.1–I1.1.8. John Wiley & Sons Inc, New York, SAD, 2001.
- Weiping W, Branwell A: Tragacanth, Karaya. U *Handbook of Hydrocolloids*, str. 231-246. Woodhead publishing, Sawston, UK, 2000.
- Williamson G, Clifford MN: Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochemical Pharmacology* 139:24-39, 2017.
- Wojtunik-Kulesza K, Oniszczuk A, Oniszczuk T, Combrzyński M, Nowakowska D, Matwijczuk A: Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic review. *Nutrients* 12:1401, 2020.
- Yu J, Ahmedna M: Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology* 48:221-237, 2013.
- Zheng Y, Lee C, Yu C, Cheng YS, Simmons CW, Zhang R, Jenkins BM, VanderGheynst JS: Ensilage and bioconversion of grape pomace into fuel ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:11128-1134, 2012.
- Zuidam NJ, Shimoni E: Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. U *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, str. 3-31. Springer, Dordrecht, Nizozemska, 2010.