

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja ISTENIČ

**MIKROKAPSULACIJA KATEHINOV IN IZVLEČKOV
GRANATNEGA JABOLKA (*Punica granatum* L.) V
POLISAHARIDNE NOSILCE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja ISTENIČ

**MIKROKAPSULACIJA KATEHINOV IN IZVLEČKOV GRANATNEGA JABOLKA
(*Punica granatum* L.) V POLISAHARIDNE NOSILCE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MICROENCAPSULATION OF CATECHINS AND POMEGRANATE (*Punica
granatum* L.) EXTRACTS INTO POLYSACCHARIDE MATRICES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 25. 9. 2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje prehrana. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrih.

Doktorska naloga je zaključek interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Bioznanosti. Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biokemijo in kemijo živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter delno na Kemijskem inštitutu in na Katedri za anorgansko kemijo na Oddelku za kemijo in biokemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Julijana KRISTL
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Član: višji znan. sod. dr. Marjan BELE
Kemijski inštitut

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka
Katja ISTENIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 641.1+664.0:547.56:615.014.6(043)=163.6
KG kapsulacija/mikrokapsulacija/dostavni sistemi/alginat/pektin/hitozan/liposomi/
funkcionalna živila/rastlinski izvlečki/granatno jabolko (*Punica granatum*
L.)/fenolne spojine/katehin/epigalokatehin galat
AV ISTENIČ, Katja, univ. dipl. mikrobiol.
SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij
Bioznanosti, področje prehrana
LI 2016
IN MIKROKAPSULACIJA KATEHINOV IN IZVLEČKOV GRANATNEGA
JABOLKA (*Punica granatum* L.) V POLISAHARIDNE NOSILCE
TD Doktorska disertacija
OP XVI, 129 str., 14 pregl., 48 sl., 4 pril., 172 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen raziskave je bil razvoj različnih sistemov za kapsulacijo katehinov in
izvlečkov granatnega jabolka. (±)-katehin in (–)-epigalokatehin-3-galat (EGCG)
smo kapsulirali v liposome, ki smo jih nadalje vključili v mikrodelce iz alginata ali
hitozana. Tako sami liposomi kot polisaharidni mikrodelci z vključenimi liposomi
so omogočali visoko učinkovitost vgradnje preučevanih antioksidantov (84-99 %).
Dokazali smo, da vgrajevanje omogoča učinkovito zaščito EGCG pred okoljskimi
pogoji (pH 2,0 in 6,0; sadni nektar), medtem ko na stabilnost (±)-katehina nima
vpliva. Interakcije med posameznimi molekulami vgradnih sistemov in EGCG smo
preučili z meritvami diferenčne dinamične kalorimetrije in infrardeče
spektroskopije s Fourierjevo transformacijo. Za izdelavo alginatnih submikronskih
delcev smo uporabili metodo emulzifikacije in na ta način pripravili alginatne delce,
velike od 120 do 660 nm, ki so iz senzoričnega vidika primernejši za rabo v
živilskih izdelkih. Sok granatnega jabolka smo vgradili v polisaharide alginat,
pektin, hitozan in pululan z metodo liofilizacije. V primeru liofiliziranih vzorcev
soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata ali pektina smo pridobili vzorce v
trdnem agregatnem stanju, ki so olajšali rokovanje s sokom in omogočili nadaljnjo
karakterizacijo. Liofilizirani vzorci z alginatom so ščitili antocianine iz soka
granatnega jabolka pred razgradnjo pri povišani temperaturi, medtem ko nobeden
izmed testiranih vzorcev ni imel zaščitne vloge pri ohranjanju antioksidativne
aktivnosti ter celokupnih polifenolnih spojin soka granatnega jabolka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 641.1+664.0:547.56:615.014.6(043)=163.6
- CX encapsulation/microencapsulation/delivery systems/alginate/pectin/chitosan/liposomes/
functional foods/plant extracts/pomegranate (*Punica granatum* L.)/phenolic
compounds/catechin/epigallocatechin gallate
- AU ISTENIČ, Katja
- AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme
in Biosciences, Field: Nutrition
- PY 2016
- TI MICROENCAPSULATION OF CATECHINS AND POMEGRANATE (*Punica
granatum* L.) EXTRACTS INTO POLYSACCHARIDE MATRICES
- DT Doctoral dissertation
- NO XVI, 129 p., 14 tab., 48 fig., 4 ann., 172 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of this study was to develop different encapsulation systems for catechins and pomegranate extracts. (\pm)-catechin and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) were encapsulated into liposomes that were further incorporated into alginate and chitosan microparticles. Liposomes alone as well as the microparticles reinforced with liposomes enabled high incorporation of the studied antioxidants (84-99%). We have shown that the incorporation was effective in protecting EGCG against degradation at pH 2.0 and pH 6.0 and in fruit nectar while it had no effect on (\pm)-catechin stability. Interactions between EGCG and the incorporation systems were evaluated by differential scanning calorimetry and Fourier transform infrared spectroscopy. In order to prepare alginate submicron particles we used encapsulation method based on emulsification. This method enabled preparation of alginate particles in the size range from 120 to 660 nm which would be more appropriate for application in food products from sensorial aspect. The pomegranate juice was incorporated into polysaccharide matrices from alginate, pectin, chitosan or pullulan using lyophilization method. Lyophilization of pomegranate juice in the presence of alginate and pectin resulted in the formation of powder that facilitated the juice handling and enabled further characterization of the complexes. The alginate complexes protected the anthocyanins from pomegranate juice against thermal degradation while none of the complexes were able to sustain the antioxidant activity and the concentration of total polyphenolic compounds of pomegranate juice.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK.....	XI
KAZALO PRILOG.....	XV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XVI
1 UVOD.....	1
1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KAPSULACIJA	3
2.1.1 Polisaharidi za kapsulacijo	4
2.1.1.1 Škrob in njegovi derivati	5
2.1.1.2 Celuloza in njeni derivati.....	6
2.1.1.3 Izvlečki in izločki rastlin	6
2.1.1.4 Morski izvlečki	8
2.1.1.5 Mikrobn in živalski polisaharidi.....	9
2.1.2 Metode kapsulacije	11
2.1.2.1 Kapsulacija z razprševanjem	11
2.1.2.2 Oblaganje z razprševanjem.....	12
2.1.2.3 Razprševanje s strjevanjem.....	12
2.1.2.4 Mikrokapsulacija z iztiskanjem talin	13
2.1.2.5 Emulzifikacija.....	13
2.1.2.6 Oblaganje plast-na-plast	13
2.1.2.7 Koacervacija	14
2.1.2.8 Kapsulacija s kapljalno metodo in premreževanjem	14
2.1.2.9 Kapsulacija z metodo emulgiranja in premreževanja notranje faze	16

2.1.2.10	Molekulska inkluzija	17
2.1.2.11	Kapsulacija v liposome.....	17
2.1.2.12	Kapsulacija s superkritičnimi fluidi.....	19
2.2	POLIFENOLNE SPOJINE.....	19
2.2.1	Katehini	21
2.2.1.1	Antioksidativno delovanje katehinov	23
2.2.1.2	Protimikrobno delovanje katehinov.....	24
2.2.1.3	Katehini v živilstvu.....	25
2.2.1.4	Stabilnost katehinov.....	25
2.2.1.5	Kapsulacija katehinov.....	26
2.2.2	Granatno jabolko.....	28
2.2.2.1	Antocianini	29
2.2.2.2	Stabilnost antocianinov granatnega jabolka	30
2.2.2.3	Uporaba izvlečkov granatnega jabolka v živilstvu.....	31
2.2.2.4	Kapsulacija izvlečkov granatnega jabolka.....	32
3	MATERIALI IN METODE.....	33
3.1	KEMIKALIJE.....	33
3.2	LABORATORIJSKA OPREMA	34
3.3	METODE.....	35
3.3.1	Karakterizacija polisaharidov kot nosilnih materialov za kapsulacijo	35
3.3.1.1	Gostota.....	35
3.3.1.2	Električna prevodnost	36
3.3.1.3	Viskoznost	37
3.3.1.4	Površinska napetost	38
3.3.2	Mikrokapsulacija (±)-katehina in EGCG.....	38
3.3.2.1	Kapsulacija (±)-katehina in EGCG v liposome.....	39
3.3.2.2	Kapsulacija (±)-katehina in EGCG v mikrodelce iz hitozana ali alginata.....	39
3.3.2.3	Kapsulacija liposomov s (±)-katehinom in EGCG v mikrodelce iz alginata ali hitozana.....	39
3.3.2.4	Učinkovitost kapsulacijskih sistemov pri zaščiti (±)-katehina in EGCG v raztopinah z različnimi vrednostmi pH in v sadnem nektarju.....	40

3.3.2.5	Določanje velikosti liposomov, zeta potenciala in polidisperznega indeksa.....	42
3.3.2.6	Morfologija mikrodelcev	43
3.3.2.7	Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in posameznimi kapsulacijskimi sistemi.....	43
3.3.3	Priprava alginatnih submikronskih delcev in kapsulacija EGCG.....	45
3.3.3.1	Priprava alginatnih submikronskih delcev.....	46
3.3.3.2	Spiranje alginatnih submikronskih delcev	46
3.3.3.3	Morfologija alginatnih submikronskih delcev.....	47
3.3.3.4	Določanje učinkovitosti kapsulacije EGCG in vsebnosti komponente v alginatnih submikronskih delcih.....	47
3.3.3.5	Sproščanje EGCG iz alginatnih submikronskih delcev s Fickovim modelom in linearnim modelom superimpozicije	47
3.3.3.6	Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in alginatnimi submikronskimi delci.....	49
3.3.4	Kapsulacija soka granatnega jabolka	49
3.3.4.1	Določanje antocianinov v soku granatnega jabolka s HPLC.....	49
3.3.4.2	Priprava liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti polisaharidov.....	50
3.3.4.3	Določanje vsebnosti celokupnih fenolnih spojin.....	50
3.3.4.4	Določanje antioksidativne aktivnosti.....	51
3.3.4.5	Določanje vsebnosti celokupnih antocianinov	52
3.3.4.6	Merjenje barve liofiliziranega soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka s polisaharidi.....	52
3.3.4.7	Učinkovitost kapsulacije.....	54
3.3.4.8	Morfologija liofiliziranih vzorcev	54
3.3.4.9	Test stabilnosti	54
3.3.4.10	Stabilnost liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka s polisaharidi v jogurtu ..	54
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	56
4.1	KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDOV	56
4.2	MIKROKAPSULACIJA (±)-KATEHINA IN EGCG	58
4.2.1	Določanje velikosti liposomov in morfologija mikrodelcev	58
4.2.2	Učinkovitost kapsulacije	62
4.2.3	Sproščanje (±)-katehina in EGCG iz mikrodelcev	65

4.2.4	Stabilnost prostega in kapsuliranega (\pm)-katehina in EGCG.....	70
4.2.5	Stabilnost prostega in kapsuliranega (\pm)-katehina in EGCG v sadnem nektarju	74
4.2.6	Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in posameznimi komponentami kapsulacijskih sistemov	75
4.3	PRIPRAVA ALGINATNIH SUBMIKRONSKIH DELCEV IN KAPSULACIJA EGCG	82
4.3.1	Priprava in morfologija alginatnih submikronskih delcev	82
4.3.2	Ločevanje alginatnih submikronskih delcev od oljne faze	85
4.3.3	Učinkovitost kapsulacije in delež EGCG v alginatnih submikronskih delcih .	86
4.3.4	Sproščanje EGCG iz alginatnih submikronskih delcev s Fickovim modelom in linearnim modelom superimpozicije.....	87
4.3.5	Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in alginatnimi submikronskimi delci	88
4.4	KAPSULACIJA SOKA GRANATNEGA JABOLKA	91
4.4.1	Določanje antocianinov v soku granatnega jabolka s HPLC	91
4.4.2	Priprava suspenzij izbranih polisaharidov v soku granatnega jabolka in liofilizacija	92
4.4.3	Učinkovitost kapsulacije	93
4.4.4	Karakterizacija soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev.....	94
4.4.5	Morfologija liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata oziroma pektina.....	95
4.4.6	Test stabilnosti	96
4.4.6.1	Vsebnost celokupnih fenolnih spojin.....	96
4.4.6.2	Antioksidativna aktivnost	98
4.4.6.3	Vsebnost antocianinov	99
4.4.6.4	Barvne analize	101
4.4.7	Stabilnost liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka s polisaharidi v jogurtu	105
4.5	OVREDNOTENJE REZULTATOV GLEDE NA ZASTAVLJENE HIPOTEZE	107
5	SKLEPI.....	109
6	POVZETEK	111
7	SUMMARY	114

8	VIRI	117
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Materiali, primerni za kapsulacijo v živilski industriji (Wandrey in sod., 2010).	5
Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin (Balasundram in sod., 2006).	20
Preglednica 3: Delovanje katehinov pri zdravljenju oziroma zaviranju nekaterih bolezni (Zaveri, 2006).	23
Preglednica 4: Redukcijski potenciali in antioksidativne aktivnosti izbranih katehinov v primerjavi z zelenim in črnim čajem ter vitaminoma E in C (Higdon in Frei, 2010).	24
Preglednica 5: Časi izpiranja in deleži mobilne faze A pri metodi določanja (\pm)-katehina in EGCG s HPLC.	41
Preglednica 6: Primeri skupin atomov in njihova značilna valovna števila (Klofutar in Rudan- Tasič, 2007).	45
Preglednica 7: Časi izpiranja in deleži mobilne faze A pri metodi določanja antocianinov v soku granatnega jabolka s HPLC.	50
Preglednica 8: Gostota, viskoznost, površinska napetost in prevodnost raztopin polisaharidov različnih koncentracij.	57
Preglednica 9: Povprečna velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial liposomov.	59
Preglednica 10: Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG ter vsebnost komponent v različnih kapsulacijskih sistemih.	65
Preglednica 11: Rezultati prileganja linearnega modela superimpozicije (enačba 15) eksperimentalnim podatkom s podanim koeficientom določenosti (R^2) in celotno napako (RMSE).	88
Preglednica 12: Opažanja o nastanku liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti različnih polisaharidov.	93
Preglednica 13: Učinkovitost kapsulacije soka granatnega jabolka v alginat (ALG) oziroma pektin (PEK) ter vrednost parametra L^* (svetlost) liofiliziranih vzorcev.	93
Preglednica 14: Vsebnost celokupnih fenolnih spojin in antocianinov ter antioksidativna aktivnost soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka z alginatom (ALG) oziroma pektinom (PEK).	95

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz dveh najpogostejših oblik kapsul: enojedrna kapsula (levo) in ogrodna kapsula (desno) (Zuidam in Shimoni, 2010).....	3
Slika 2: Kemijska struktura pektina (de Vos in sod., 2010).....	7
Slika 3: Struktura alginata; M: β -D-manuronska kislina, G: α -L-guluronska kislina (a) ter simbolni prikaz verige alginata (b) (Draget in sod., 2006).	9
Slika 4: Kemijska struktura hitina (a) in hitozana (b); A – acetilirana enota, D - deacetilirana enota (Vårum in Smidsrød, 2006).....	10
Slika 5: Kemijska struktura pululana s ponavljajočimi se enotami maltotrioze (Singh in sod., 2008).	11
Slika 6: Shematski prikaz kapsulatorja z vibrirajočo komoro (Encapsulator B-390/B-395 Pro Technical data sheet, 2015).....	15
Slika 7: Kemijska struktura fosfatidilholina (Wandrey in sod., 2010).....	17
Slika 8: Shematski prikaz strukture liposoma (Wandrey in sod., 2010).....	18
Slika 9: Osnovna struktura flavonoida (Thilakarathna in Rupasinghe, 2013).	20
Slika 10: Kemijske strukture katehinov iz zelenega čaja: epikatehini (a), katehini (b) in (\pm)-katehin (c). G – galna kislina (Ananingsih in sod., 2013).	22
Slika 11: Kemijski strukturi dimerov EGCG teasinensina A in P2 (Bansal in sod., 2013).	26
Slika 12: Osnovna struktura antocianinov (Lee in sod., 2005).	29
Slika 13: Prevladujoče strukturne oblike antocianinov pri posameznih vrednostih pH (Giusti in Wrolstad, 2001).....	30
Slika 14: Primer absorpcijskega IR-spektra (butanal) (Hunt, 2016).....	44
Slika 15: Korelacijski diagram nekaterih funkcionalnih skupin (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007).	45
Slika 16: Ponazoritev barvnega prostora CIE L*a*b* (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007).	53
Slika 17: Slike svetlobne mikroskopije praznih mikrodcelcev iz alginata ali hitozana (a, b), mikrodcelcev iz alginata ali hitozana s kapsuliranimi liposomi s (\pm)-katehinom (c, d) ter mikrodcelcev iz alginata ali hitozana s kapsuliranimi liposomi z EGCG (e, f).	61
Slika 18: Slike SEM mikrodcelcev iz alginata z vključenimi liposomi pred (a) in po soniciranju (b) ter mikrodcelcev iz hitozana z vključenimi liposomi pred (c) in po soniciranju (d).	62
Slika 19: Shematski prikaz možnih interakcij ($-$)-epikatehin galata s fosfolipidnimi dvosloji (Uekusa in sod., 2007).	64

Slika 20: Sproščanje (\pm)-katehina (a) in EGCG (b) iz alginatnih mikrodelcev v vodi, pri 25 °C.	65
Slika 21: Sproščanje (\pm)-katehina (a) in EGCG (b) iz mikrodelcev iz hitozana v vodi, pri 25 °C.	66
Slika 22: Sproščanje (\pm)-katehina iz liposomov (a), iz mikrodelcev iz alginata z vključenimi liposomi (b) in iz mikrodelcev iz hitozana z vključenimi liposomi (c) pri različnih vrednostih pH: Δ pH 2,0; \bullet pH 4,0; \square pH 6,0; pri 25 °C.	67
Slika 23: Sproščanje EGCG iz liposomov (a), iz mikrodelcev iz alginata z vključenimi liposomi (b) in iz mikrodelcev iz hitozana z vključenimi liposomi (c) pri različnih vrednostih pH: Δ pH 2,0; \bullet pH 4,0; \square pH 6,0; pri 25 °C.	68
Slika 24: Stabilnost (\pm)-katehina pri pH 2,0 (a), pH 4,0 (b) in pH 6,0 (c) pri T = 25 °C.	71
Slika 25: Stabilnost EGCG pri pH 2,0 (a), pH 4,0 (b) in pH 6,0 (c) pri T = 25 °C.	72
Slika 26: Primer HPLC kromatograma EGCG po različnih časih inkubacije pri pH 6,0.	73
Slika 27: Stabilnost (\pm)-katehina (a) in EGCG (b) v sadnem nektarju (pH = 3,4) pri T = 25 °C.	74
Slika 28: Krivulje DSC EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), alginata (ALG), alginatnih mikrodelcev z EGCG (ALG MD + EGCG), alginatnih mikrodelcev z liposomi (ALG MD + LIP) ter alginatnih mikrodelcev z liposomi s kapsuliranim EGCG (ALG MD + LIP + EGCG).	77
Slika 29: Krivulje DSC EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), hitozana (HIT), mikrodelcev iz hitozana z EGCG (HIT MD + EGCG), mikrodelcev iz hitozana z liposomi (HIT MD + LIP) ter mikrodelcev iz hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG (HIT MD + LIP + EGCG).	78
Slika 30: Spektri FTIR EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), alginata (ALG), alginatnih mikrodelcev z EGCG (ALG MD + EGCG), alginatnih mikrodelcev z liposomi (ALG MD + LIP) ter alginatnih mikrodelcev z liposomi s kapsuliranim EGCG (ALG MD + LIP + EGCG).	80
Slika 31: Spektri FTIR EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), hitozana (HIT), mikrodelcev iz hitozana s kapsuliranim EGCG (HIT MD + EGCG), mikrodelcev iz hitozana z liposomi (HIT MD + LIP) ter mikrodelcev iz hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG (HIT MD + LIP + EGCG).	81
Slika 32: Slike SEM liofiliziranih alginatnih delcev, pripravljenih z različnimi formulacijami.	83
Slika 33: Slike SEM na zraku posušenih praznih alginatnih delcev (a) in alginatnih delcev s kapsuliranim EGCG (b) na membranskem filtru.	84

Slika 34: Porazdelitev velikosti praznih alginatnih delcev (a) in alginatnih delcev s kapsuliranim EGCG (b).	84
Slika 35: Emulzije v različnih korakih priprave alginatnih submikronskih delcev, obarvane z barvilom Sudan II.....	86
Slika 36: Alginatni submikronski delci v oljni fazi, obarvani z oranžnim barvilom Sudan II (a), alginatni submikronski delci v destilirani vodi po prvem koraku spiranja (b) ter alginatni submikronski delci v destilirani vodi po končanem spiranju (c).	86
Slika 37: Opis sproščanja EGCG iz alginatnih submikronskih delcev s Fickovim modelom (enačba 13) (---) in linearnim modelom superimpozicije (enačba 15) (—) pri 37 °C v 0,1 M HCl (pH 1,2) (a) in v fosfatnem pufru (pH 7,2) (b)	88
Slika 38: Krivulje DSC EGCG, CaCl ₂ x 2H ₂ O, alginata (ALG), alginatnih submikronskih delcev (ALG SD) ter alginatnih submikronskih delcev s kapsuliranim EGCG (ALG-EGCG SD).	89
Slika 39: Spektri FTIR EGCG, alginatnih submikronskih delcev (ALG SD) in alginatnih submikronskih delcev s kapsuliranim EGCG (ALG-EGCG SD).....	91
Slika 40: Reprezentativni HPLC kromatogram soka granatnega jabolka z identificiranimi antocianini (povzeto po Slatinek, 2015).	92
Slika 41: Slike SEM liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom v različnih masnih razmerjih.....	96
Slika 42: Vsebnost celokupnih fenolnih spojin v soku granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcih soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata ali pektina, inkubiranih v temi pri 60 °C.....	98
Slika 43: Antioksidativna aktivnost soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom oziroma pektinom, inkubiranih v temi pri 60 °C. ...	99
Slika 44: Delež preostalih antocianinov v soku granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcih soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom, inkubiranih v temi pri 60 °C. ...	100
Slika 45: Izvlečki antocianinov iz liofiliziranega soka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom oziroma pektinom po različnih časih inkubacije pri 60 °C.	101
Slika 46: Parametri L* (a), a* (b) in b* (c) soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom, inkubiranih pri 60 °C.....	103
Slika 47: ΔE (a), C* (b) in BI (c) soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom, inkubiranih pri 60 °C.	104
Slika 48: Vsebnost celokupnih fenolnih spojin (a), antioksidativna aktivnost (b) ter vsebnost antocianinov (c) v vzorcih jogurta z dodanimi liofiliziranim sokom granatnega	

jabolka (Δ), liofiliziranimi vzorci soka in alginata v masnem razmerju 25:1 (\times) ter liofiliziranimi vzorci soka in pektina v masnem razmerju 25:1 (\blacktriangle). 106

KAZALO PRILOG

Priloga A: Dovoljenje za objavo članka z naslovom »Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles« v doktorski disertaciji v tiskani in elektronski obliki.

Priloga B: Članek »Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles«.

Priloga C: Dovoljenje za objavo članka z naslovom: »Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes« v doktorski disertaciji v tiskani in elektronski obliki.

Priloga D: Članek »Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes«.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
EGCG	(-)-epigalokatehin-3-galat
FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
GRAS	status varne snovi (angl. Generally Recognized as Safe)
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
K	konstanta celice za merjenje električne prevodnosti
Parameter a*	barve na osi rdeča-zelena
Parameter b*	barve na osi rumena-modra
Parameter C*	nasičenost (angl. Chroma)
Parameter L*	svetlost
PGPR	poliglicerol poliricinoleat
R ²	koeficient določenosti
RMSE	celotna napaka (angl. Root Mean Square Error)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (angl. Scanning Electron Microscopy)
SHW	parameter za oceno natančnosti spremenljivk (angl. Standardised Halved Width)
SSE	vsota kvadratov napak (angl. Sum of Squared Error)
TPP	natrijev tripolifosfat
η	dinamična viskoznost
ν	kinematična viskoznost
χ	specifična električna prevodnost

1 UVOD

Katehini predstavljajo pomembno skupino polifenolnih spojin v zelenem čaju (*Camelia sinensis*); med njimi je najbolj zastopan (–)-epigalokatehin-3-galat (EGCG), ki mu pripisujejo tudi največjo biološko aktivnost (Ananingsih in sod., 2013). Katehini imajo kot močni antioksidanti številne pozitivne učinke za zdravje; delujejo antikancerogeno, kardioprotektivno in ščitijo pred razvojem nevrodegenerativnih bolezni (Zaveri, 2006). Pripisujejo jim tudi protimikrobne učinke, saj dokazano zavirajo rast tako grampozitivnih kot gramnegativnih bakterij (Perumalla in Hettiarachchy, 2011). Poleg tega, da katehini lahko predstavljajo sestavino funkcionalnih živil, je njihova raba zanimiva tudi kot nadomeščanje sintetičnih antioksidantov in konzervansov. Raziskave so pokazale, da katehini med drugim lahko preprečijo oksidacijo lipidov v mesu in ribah ter podaljšajo obstojnost različnih rastlinskih olj (Chen in Chan, 1996; Tang in sod., 2001). Kljub temu je raba katehinov v živilstvu omejena, saj so podvrženi razgradnji med procesiranjem in shranjevanjem živil, kjer so izpostavljeni povišani temperaturi, nizkim in visokim vrednostim pH ter prisotnosti kisika, prostih radikalov in nekaterih kovinskih ionov.

Različne polifenolne spojine so bogato zastopane tudi v plodovih granatnega jabolka, ki mu prav tako pripisujejo številne zdravilne učinke; med drugim delujejo protivirusno, protibakterijsko in antikancerogeno ter ščitijo ožilje in prebavni trakt (Teixeira da Silva in sod., 2013). Dodatek sestavin granatnega jabolka živilom poveča njihovo prehransko vrednost in funkcionalnost, poleg tega s preprečevanjem oksidacije podaljša obstojnost živil. Kot dodatek se lahko uporabljajo sok iz zrn oziroma aril granatnega jabolka ali pa izvlečki lupine in semen (Ahmed in sod., 2015; Mastrodi Salgado in sod., 2012). Sok granatnega jabolka je bogat z antocianini, ki dajejo sadežu značilno temno rdečo barvo. Antocianini so za živilsko industrijo zanimivi zlasti kot naravna barvila, ki bi lahko nadomestila sintetična barvila. Njihovo rabo omejuje slaba stabilnost, saj so podvrženi strukturnim spremembam pod vplivom pH. Najbolj razširjena je uporaba antocianinov v živilih z nizkim pH, saj le tako lahko zagotovimo stabilno strukturo antocianinov in s tem barvo izdelkov (Shipp in Abdel-Aal, 2010).

Ena od možnosti, ki omogočajo ohranitev stabilne oblike aktivnih snovi tudi v neugodnih okoljskih pogojih, je kapsulacija, ki predstavlja vklapljanje bioaktivnih spojin v nosilne materiale, ki omogočajo sproščanje jedrne komponente pod specifičnimi pogoji. Namen naše raziskave je bil razvoj kapsulacijskih sistemov, ki bi omogočili stabilizacijo katehinov in soka granatnega jabolka pri neugodnih okoljskih pogojih.

Pri razvoju kapsulacijskih sistemov smo se osredotočili na rabo naravnih polisaharidov kot ogrodnih materialov. V prvem delu doktorske naloge smo izbrane polisaharide okarakterizirali z merjenjem gostote, viskoznosti, površinske napetosti in električne

prevodnosti. Pridobljeni rezultati meritev so nam bili v pomoč pri nadaljnji izbiri materialov za določeno metodo kapsulacije.

V drugem delu doktorske naloge smo se ukvarjali s kapsulacijo (\pm)-katehina in EGCG v mikrodelce iz alginata ali hitozana, v liposome in v mikrodelce iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi. Mikrodelce smo pripravili z mikrokapsulatorjem, ki omogoča pripravo delcev, večjih od 150 μm . Z namenom izdelave manjših delcev, ki bi bili iz senzoričnega vidika bolj primerni za rabo v živilskih izdelkih, smo se v tretjem delu doktorske naloge posvetili optimizaciji priprave alginatnih submikronskih delcev z metodo emulzifikacije in premreževanja notranje faze (Paques in sod., 2012). Alginatne submikronske delce smo okarakterizirali na podlagi kapsulacije EGCG. V četrtem delu doktorske naloge smo se ukvarjali s pripravo liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka ob prisotnosti različnih polisaharidov. Poleg zaščite polifenolnih spojin v soku granatnega jabolka je bil cilj liofilizacije tudi omogočiti olajšano rokovanje s sokom.

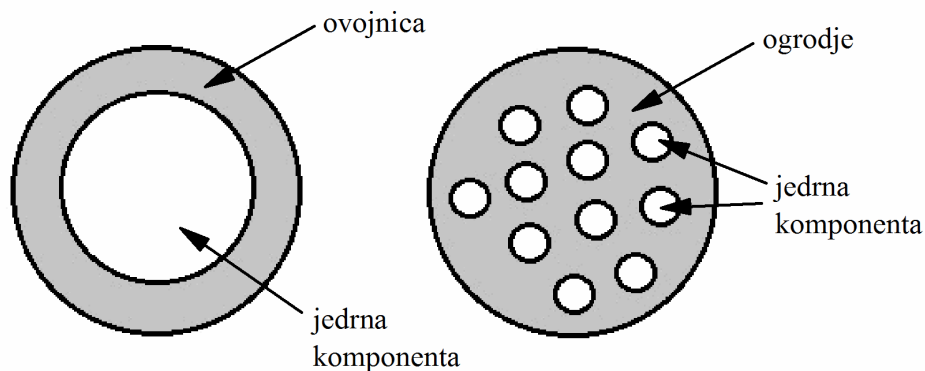
1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- Z izbiro ustreznih kombinacij materialov na osnovi naravnih polisaharidov je možno pridobiti mikrokapsule z manj poroznim matriksom ter tako omogočiti kapsulacijo majhnih, nenabitih molekul. Z ustrežno metodo kapsulacije je možno izdelati polisaharidne mikrokapsule primernih velikosti, ki iz senzoričnega vidika omogočajo širok spekter uporabe v živilski industriji.
- Kapsulacija polifenolnih spojin (EGCG in ekstrakt granatnega jabolka) v polisaharidne delce ščiti polifenolne spojine pred okoljskimi pogoji ter tako poveča njihovo stabilnost. Polisaharidni delci omogočajo kontrolirano sproščanje polifenolnih spojin pod *in vitro* pogoji.
- Testiranje kapsuliranih polifenolnih spojin (EGCG in ekstrakt granatnega jabolka) v realnem sistemu (sok/jogurt) poda informacijo o aplikativnosti kapsul.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KAPSULACIJA

Kapsulacija predstavlja proces vgrajevanja snovi v tekočem, trdnem ali plinastem agregatnem stanju v nosilne materiale, ki omogočajo kontrolirano sproščanje vgrajene snovi pod specifičnimi pogoji. Nastale kapsule so lahko velike od nekaj nanometrov do več milimetrov in jih glede na velikost poimenujemo nanokapsule, mikrokapsule ali velike kapsule oziroma krajše kapsule. Glede na zgradbo sta najpogostejši obliki kapsul kapsula, ki jo sestavljata jedro in ovojnica ter ogrodna kapsula, pri kateri je kapsuliran material porazdeljen v enotnem ogrodju (slika 1) (Desai in Jin Park, 2005). Slednje v literaturi najdemo tudi pod drugačnimi imeni, npr. mikrosfere in nanosfere.



Slika 1: Shematski prikaz dveh najpogostejših oblik kapsul: enojedrna kapsula (levo) in ogrodna kapsula (desno) (Zuidam in Shimoni, 2010).

Figure 1: Schematic representation of the two most common types of the capsules: mononuclear capsule (left) and aggregate (right) (Zuidam and Shimoni, 2010).

Razlogi za kapsulacijo v živilski industriji so raznoliki:

- kapsulacija zmanjša vpliv zunanjih dejavnikov, kot so temperatura, relativna vlaga, kisik in svetloba, na aktivno spojino ter jo na ta način zaščiti pred razgradnjo;
- zmanjšuje izhlapevanje oziroma izgubo aktivne spojine;
- spremeni fizikalne lastnosti prvotne oblike aktivne spojine ter na ta način olajša rokovanje z aktivno spojino;
- omogoča kontrolirano sproščanje aktivne spojine s časom oziroma sprostitvev aktivne spojine ob določenem času;
- zamaskira neprijeten okus ali vonj aktivne spojine;
- omogoča redčenje aktivne spojine ter hkrati enakomerno distribucijo v končnem produktu v primerih, kadar so zaželeno zelo nizke koncentracije aktivne spojine;

- omogoča ločevanje različnih aktivnih spojin, ki bi sicer reagirale med seboj (Desai in Jin Park, 2005).

Slabost kapsulacije predstavljajo dodatni stroški ter povečana kompleksnost proizvodnega procesa. Poleg tega lahko potrošniki poročajo o neželenih lastnostih živila s kapsuliranimi komponentami, vprašljiva pa je tudi stabilnosti kapsulirane aktivne spojine med samim procesiranjem ter med shranjevanjem živila (Zuidam in Shimoni, 2010).

2.1.1 Polisaharidi za kapsulacijo

Za kapsulacijo so na voljo številni materiali, vendar ima le omejeno število materialov status GRAS (Generally Recognized as Safe) in se sme uporabljati v živilski industriji. Regulacija na področju prehranskih dodatkov je mnogo strožja kot v primeru farmacevtskih izdelkov ali kozmetike. Na mednarodnem nivoju področje prehranskih dodatkov ureja Skupni strokovni odbor FAO/WHO za aditive in živila (JECFA), medtem ko v Evropi na tem področju deluje Evropska agencija za varnost hrane (EFSA). Mnoge komponente, ki se uporabljajo za kapsulacijo zdravilnih učinkovin, za rabo v živilski industriji niso primerne. Primer predstavlja sintetičen ko-polimer poliglikolne in polimlečne kisline (PLGA), ki je odobren s strani Evropske agencije za zdravila (Sharma in sod., 2016) vendar v živilstvu dostavni sistemi iz PLGA niso klasificirani kot varni (Ribeiro in sod., 2010). Poleg tega se regulacije v različnih državah razlikujejo, kar morajo proizvajalci živil upoštevati v primeru izvoza produktov ali razširitve trga (Wandrey in sod., 2010).

Materiali, ki so primerni za kapsulacijo v živilski industriji, so naštet v preglednici 1. Pogosto posamezen ogrodni material ne zadostuje vsem kriterijem za učinkovito kapsulacijo, zato se v praksi velikokrat uporablja kombinacija različnih materialov. V osnovni ogrodni material se lahko vključijo tudi snovi, kot so antioksidanti, kelatorji in surfaktanti (Desai in Jin Park, 2005).

Izbira metode kapsulacije in ogrodnega materiala sta medsebojno odvisni. Glede na izbrano metodo kapsulacije izberemo ustrezen ogrodni material in obratno (Desai in Jin Park, 2005). Kot ogrodni materiali so v živilski industriji najbolj razširjeni polisaharidi (Gadkari in Balaraman, 2014). Polisaharidi so homo- ali ko-polimeri, sestavljeni iz sladkornih ostankov in/ali njihovih derivatov. Veliko naravnih polisaharidov vsebuje majhen delež ostankov peptidov, ki sodelujejo pri biosintezi polisaharidov, vendar se jih večina odstrani med postopki izolacije in obdelave polisaharida. Številni naravni polisaharidi predstavljajo pomembno surovino za izdelavo kemijsko modificiranih materialov. Pomembna lastnost nekaterih polisaharidov je, da v mrzli ali vroči vodi hidrirajo in že pri nizkih koncentracijah tvorijo viskozne raztopine ali disperzije. Takšne polisaharide označujemo kot hidrokoloide. Ločimo naravne hidrokoloide (rastlinski izločki) ter hidrokoloide, ki jih pridobimo s kemijsko

modifikacijo naravnih polisaharidov (derivati škroba, celuloze in hitina) (Wandrey in sod., 2010).

Preglednica 1: Materiali, primerni za kapsulacijo v živilski industriji (Wandrey in sod., 2010).

Table 1: Materials suited for capsulation in the food industry (Wandrey et al., 2010).

Izvor	Ogljikovi hidrati	Proteini	Lipidi
rastlinski	škrob in njegovi derivati celuloza in njeni derivati rastlinski izločki: <ul style="list-style-type: none">- arabski gumi- karaja- meskite rastlinski izvlečki: <ul style="list-style-type: none">- galaktomanani- pektin- topni sojini polisaharidi	gluten (pšenica) proteinski izolati iz graha in soje	maščobne kisline, alkoholi gliceridi voski fosfolipidi
morski	karagenan alginat		
mikrobni/ živalski	ksantan dekstran hitozan pululan	kazein proteini sirotke želatina	maščobne kisline, alkoholi gliceridi voski fosfolipidi (šelak)

2.1.1.1 Škrob in njegovi derivati

Škrob je polimer α -D-glukoze s splošno kemijsko sestavo $(C_6H_{10}O_5)_n$. Sestavljen je iz linearnih verig amiloze (20-30 %) in razvejanih verig amilopektina (70-80 %). Škrob je v obliki belega prahu in je netopen v hladni vodi, etanolu in najpogosteje uporabljenih topilih. Poleg naravnega so na trgu prisotni tudi številni derivati škroba, ki vključujejo zamrežene, oksidirane, acetilirane, hidroksipropilirane in delno hidrolizirane molekule. Namen modificiranja je izboljšanje lastnosti škroba ter posledično večji spekter uporabe. Npr. pri zamreženju določen del vodikovih vezi med verigami škroba nadomestijo kovalentne vezi. Posledično škrob v prisotnosti vode ne nabreka ter je bolj odporen proti povišani temperaturi in strižnim silam. Izmed derivatov škroba se kot ogrodni material za kapsulacijo pogosto uporabljata maltodekstrin in ciklodekstrin (Taggart in Mitchell, 2009; Wandrey in sod., 2010).

2.1.1.2 Celuloza in njeni derivati

Celuloza je polimer β -D-glukočnih enot, ki so med seboj povezane z β -(1 \rightarrow 4) glikozidnimi vezmi. V nasprotju s škrobom, kjer so vse skupine $-\text{CH}_2\text{OH}$ orientirane vzdolž iste strani molekulske ravnine, so v celulozi skupine $-\text{CH}_2\text{OH}$ orientirane izmenično nad in pod ravnino molekule. Zaradi odsotnosti stranskih verig se lahko molekule celuloze organizirajo tesno skupaj in tvorijo rigidne strukture. Celuloza je netopna v vodi in običajnih topilih (Wandrey in sod., 2010).

Hidroksilne skupine celuloze lahko delno ali popolnoma reagirajo z različnimi reagenti, kar se izkorišča za pridobivanje derivatov celuloze z želenimi lastnostmi. Derivati celuloze s statusom GRAS so metilceluloza, hidroksipropil celuloza, hidroksipropil metilceluloza, etil metilceluloza, etilceluloza ter natrijeva karboksi metilceluloza (Murray, 2009; Wandrey in sod., 2010).

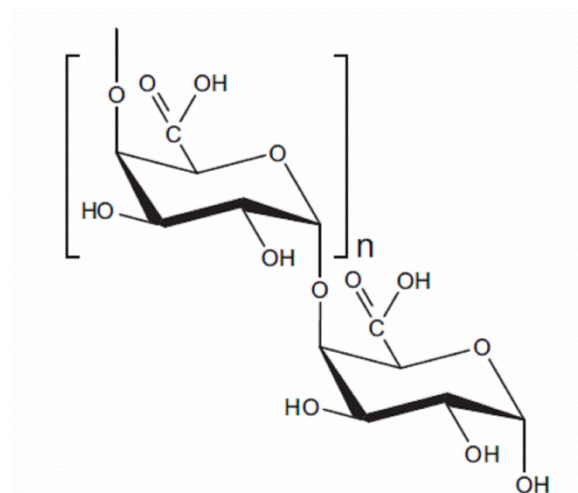
2.1.1.3 Izvlečki in izločki rastlin

Polisaharidni izvlečki in izločki rastlin so običajno mešanice oligomerov in polimerov različnih kemijskih struktur in konfiguracij. Kot ogrodni materiali za kapsulacijo se pogosto uporabljajo rastlinski izločki, kot so arabski gumi, tragakant, karaja in meskite. Izločanje polisaharidnih polimerov pri rastlinah je posledica dejavnikov stresa, kot so nastanek ran ter pojav vročine ali suše. Danes gojimo le nekaj vrst rastlin z namenom pridobivanja rastlinskih izločkov za živilsko industrijo. Večina jih pripada družini Leguminosae. Izmed polisaharidnih izvlečkov rastlin se za kapsulacijo najpogosteje uporabljajo galaktomanani, pektin in topni sojini proteini (Wandrey in sod., 2010).

Arabski gumi je najstarejši poznan rastlinski izloček. Pridobivajo ga iz stebel in vej rastlin *Acacia senegal* in *Acacia seyal*. Arabski gumi je razvejana nevtralna ali rahlo kislina, sestavljena iz oligosaharida arabinogalaktana, polisaharidov in glikoproteinov. Osnovno strukturo predstavlja glavna veriga iz D-galaktopiranozilnih enot, povezanih z β -(1 \rightarrow 3) vezmi. Na glavno verigo so z (1 \rightarrow 6) vezmi vezane stranske verige, sestavljene iz dveh do petih D-galaktopiranozilnih enot, ki so med seboj povezane z β -(1 \rightarrow 3) vezmi. Arabski gumi je brez vonja, barve in okusa. Topen je tako v mrzli kot v vroči vodi v koncentracijah do 50 % (m/v) (Wandrey in sod., 2010). Arabski gumi je zelo dober emulgator in se pogosto uporablja za stabilizacijo emulzij, saj obda oljne kapljice s čvrstim filmom in prepreči njihovo agregacijo (Krishnan in sod., 2005).

Pektin je negativno nabit linearni polimer, sestavljen in vsaj 65 % (m/m) ostankov D-galakturonske kisline, ki so med seboj povezani z α -(1 \rightarrow 4) vezmi. Preostali delež polimera

sestavljajo sladkorji, kot so L-ramnoza, D-galaktoza, L-arabinoza in D-ksiloza (slika 2) (de Vos in sod., 2010).



Slika 2: Kemijska struktura pektina (de Vos in sod., 2010).

Figure 2: Chemical structure of pectin (de Vos et al., 2010).

Pektini se med seboj razlikujejo po stopnji esterifikacije karboksilne skupine na ostankih galakturonske kisline, ki se navadno giblje med 20 % in 80 %. Pektine s stopnjo esterifikacije več kot 50 % uvrščamo med visoko esterificirane pektine, medtem ko pektine z manj kot 50 % stopnjo esterifikacije uvrščamo med nizko esterificirane pektine. Tvorba pektinskih gelov je odvisna od stopnje esterifikacije. Pektini z visoko stopnjo esterifikacije tvorijo gele le v prisotnosti sladkorjev ali drugih ko-topljencev pri nizkih vrednostih pH, medtem ko pektini z nizko stopnjo esterifikacije tvorijo gele v prisotnosti kalcijevih ionov. Glavni vir pektina predstavljajo olupki citrusov in jabolka ter ostanki pri pridelavi citrusovih in jabolčnih sokov ter olj (Wandrey in sod., 2010).

Galaktomanani so skupina treh rastlinskih izločkov: polimeri rožičevca, tara in guar. Sestavljeni so iz linearnih verig β -D-manopiranozilnih enot, ki so med seboj povezane z (1 \rightarrow 4) vezmi. Na vsako četrto (polimerni izločki rožičevca), tretjo (polimerni izločki tara) ali drugo (polimerni izločki guar) enoto β -D-manopiranozilnih ostankov je z (1 \rightarrow 6) vezjo vezana stranska enota α -D-galaktopiranozilnega ostanka. Topnost galaktomananov se povečuje s številom stranskih verig. Polimerni izločki guar so pri sobni temperaturi popolnoma topni v vodi, topnost polimernih izločkov tara je pri istih pogojih 70 %, medtem ko s segrevanjem nad 70 °C dosežemo popolno topnost. Polimerni izločki rožičevca pri temperaturah pod 60 °C nabrekajo in postanejo topni pri temperaturah nad 60 °C. Rastopine vseh treh vrst polimernih izločkov izkazujejo psevdoplastične lastnosti (Wandrey in sod., 2010).

Topni sojini polisaharidi so sestavljeni iz ostankov galaktoze, arabinoze in galakturonske kisline, vendar točna sestava ni povsem znana. Pridobivamo jih iz ostankov sojinih zrn po izolaciji sojinega olja in proteinov. Vodne raztopine topnih sojinih polisaharidov ne tvorijo gelov in imajo nizko viskoznost. Topni sojini polisaharidi imajo sposobnost adhezije in tvorjenja filmov, ki so običajno brezbarvni, transparentni in topni v vodi. Topni sojini polisaharidi se uporabljajo za preprečevanje oksidacije olj, za stabilizacijo proteinov pri nizkih vrednostih pH ter kot emulgatorji ali stabilizatorji emulzij (Wandrey in sod., 2010).

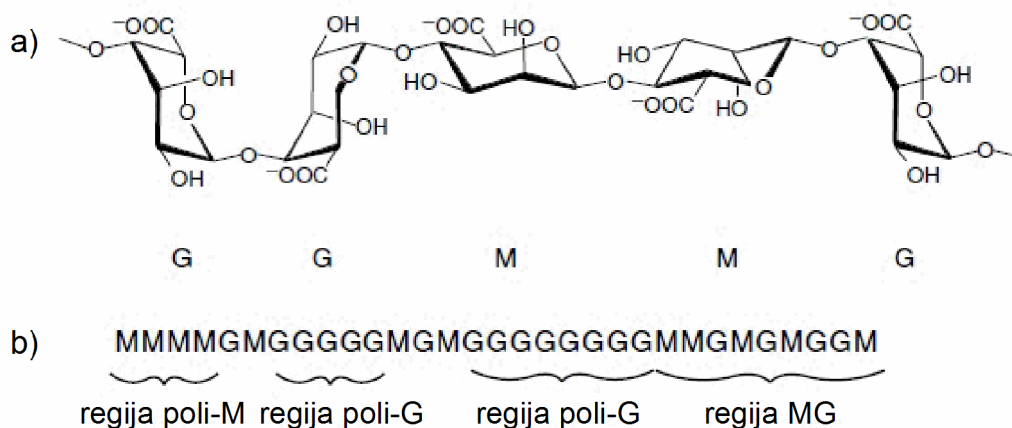
2.1.1.4 Morski izvlečki

Morske alge predstavljajo bogat vir različnih polisaharidov za številne industrijske aplikacije, med njimi tudi za kapsulacijo.

Karagenan pridobivajo iz rdečih morskih alg (Rhodophyceae). Sestavljeni so iz kalijevih, natrijevih, kalcijevih, magnezijevih in amonijevih sulfatnih estrov galaktoze in 3,6-anhidrogalaktoze. Sladkorne enote so med seboj povezane z izmenjujočimi se β -(1 \rightarrow 3) in α -(1 \rightarrow 4) glikozidnimi vezmi. Poznamo tri tipe karagenanov; κ (kappa), ι (iota) in λ (lambda). Med seboj se razlikujejo po številu in položaju sulfatnih skupin, kar daje vsakemu tipu specifične lastnosti. Večje število sulfatnih skupin zniža temperaturo tališča in vodi do nastanka šibkejših gelov ali pa geliranje celo onemogoči. Karagenani lahko tvorijo viskozne raztopine in termično reverzibilne gele, katerih tekstura je lahko mehka in elastična ali pa trdna in lomljiva (Wandrey in sod., 2010).

Alginat je kemijsko ko-polimer ostankov β -D-manuronske kisline (M) in α -L-guluronske kisline (G), ki so med seboj povezani z (1 \rightarrow 4) vezmi (slika 3a). V polimeru se izmenjujejo regije poli-M in poli-G, ki smo med seboj ločene z odseki, v katerih se enote M in G izmenjujejo (slika 3b). Vir alginata so rjave alge, pri katerih alginat predstavlja do 40 % suhe snovi (Draget in sod., 2006).

V vodnih raztopinah je alginat negativno nabit in v prisotnosti divalentnih kationov tvori gele. Divalentni kationi (npr. Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{2+}) se vežejo le na odseke poli-G; pri tem se ena regija poli-G poveže z drugo regijo poli-G na sosednji verigi alginata (model škatle za jajca), kar vodi do nastanka gela. Glede na kemijsko strukturo alginata lahko mehanske značilnosti alginatnih gelov zelo variirajo. Geli iz alginata z visoko vsebnostjo enot G so bolj čvrsti kot geli alginata z nižjo vsebnostjo enot G. Pomembno vlogo imajo tudi molekulska masa alginata ter zaporedje posameznih regij (Lee in Mooney, 2012). Na področju kapsulacije se alginat najpogosteje uporablja pri metodi kapljanja mešanice natrijevega alginata in aktivne jedrne spojine v raztopino kalcijevih ionov.



Slika 3: Struktura alginata; M: β -D-manuronska kislina, G: α -L-guronska kislina (a) ter simbolni prikaz verige alginata (b) (Draget in sod., 2006).

Figure 3: Structure of alginate; M: β -D-mannuronic acid, G: α -L-guluronic acid (a), and symbolic representation of alginate chain (Draget et al., 2006).

2.1.1.5 Mikrobni in živalski polisaharidi

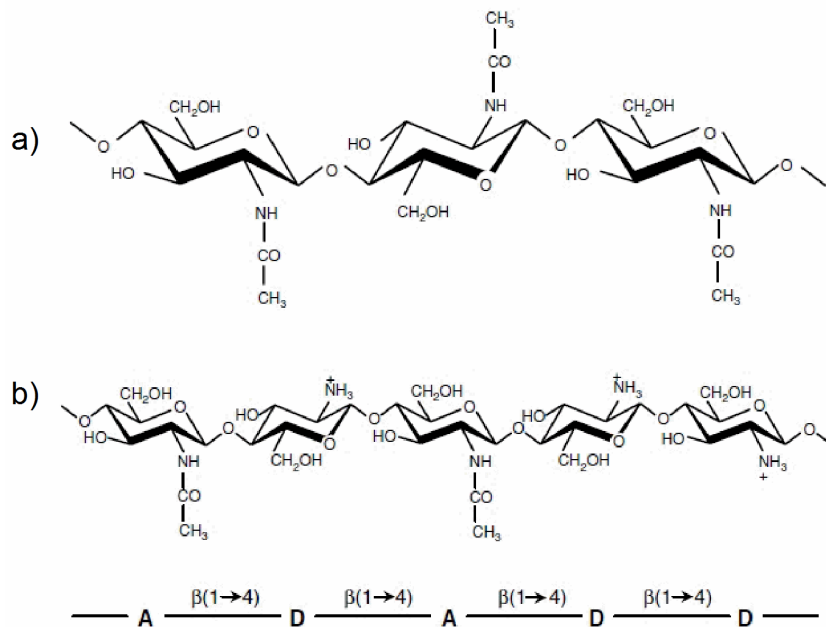
Mikrobni in živalski polisaharidi se odlikujejo po novih in pogosto edinstvenih funkcionalnih lastnostih. V živilstvu so zlasti zanimivi ksantan, hitozan in pululan.

Ksantan proizvaja bakterija *Xanthomonas campestris* med aerobno fermentacijo glukoze. Ksantan je anionski polisaharid v obliki natrijeve, kalijeve ali kalcijeve soli. Glavna veriga molekule ksantana je sestavljena iz D-glukopiranozilnih enot, ki so med seboj povezane z β -(1 \rightarrow 4) vezmi. Na vsaki drugi enoti je na pozicijo C-3 pripeta trisaharidna stranska veriga, sestavljena iz ene D-glukuronozilne enote med dvema D-manozilnima enotama. Ksantan je topen v hladni vodi in večinoma ne tvori gelov. Zaradi zaščite glavne verige s stranskimi verigami je ksantan zelo odporen proti encimatski razgradnji (Wandrey in sod., 2010).

Hitozan je kemijsko ko-polimer iz naključno razporejenih enot D-glukozamina in N-acetil-D-glukozamina, ki so med seboj povezane z β -(1 \rightarrow 4) vezmi (slika 4). Pridobivajo ga z alkalno deacetilacijo hitina, ki je kot sestavni del zunanjega skeleta živali ter kot komponenta celične stene nekaterih gliv in alg drugi najbolj zastopan naravni polimer na svetu (Wandrey in sod., 2010).

Hitozan je kationski polielektrolit. Gostota naboja na verigah hitozana ter topnost sta odvisni od stopnje deacetilacije. Hitozan je topen v kislem vodnem mediju, če njegova stopnja deacetilacije doseže okrog 50 %. Izjemo predstavljajo oligomeri, ki so topni v širšem

območju pH. Hitozan tvori gele v prisotnosti nasprotno nabitega alginata ali v prisotnosti polifosfatnih ionov, poleg tega ima sposobnost tvorbe filmov (Wandrey in sod., 2010).

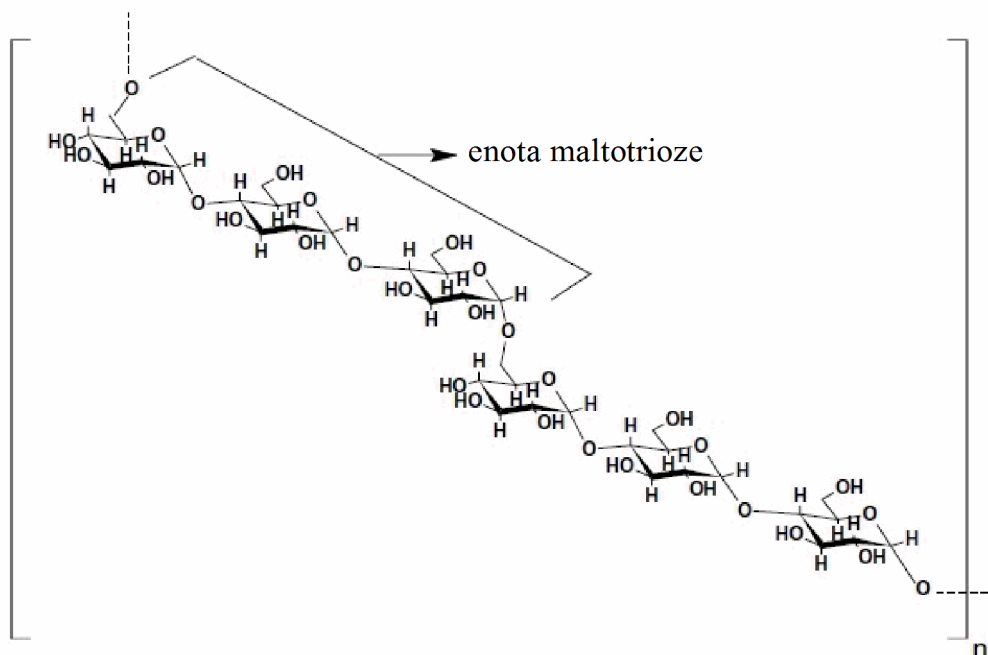


Slika 4: Kemijska struktura hitina (a) in hitozana (b); A – acetilirana enota, D - deacetilirana enota (Vårum in Smidsrød, 2006).

Figure 4: Chemical structure of chitin (a) and chitosan (b); A – acylated unit, D – deacetylated unit (Vårum and Smidsrød, 2006).

Pululan je nevtralni polisaharid, sestavljen iz ponavljajočih se enot maltotrioze, ki so med seboj povezane z α -(1 \rightarrow 6)-vezmi. Glukozi ostanki znotraj maltotrizonih enot so med seboj povezani z α -(1 \rightarrow 4)-glikozidnimi vezmi (slika 5). Pululan proizvaja gliva *Aureobasidium pullulans*. Sinteza poteka v notranjosti celice, nato pa pride do izločanja pululana na površje, kjer tvori ohlapno sluzasto plast okrog celice (Cheng in sod., 2011).

Edinstvene fizikalne lastnosti pululana med drugim omogočajo tvorbo vlaken, modeliranje s stiskanjem ter tvorbo močnih filmov, neprepustnih za kisik. Pululan je dobro topen v vodi, netopen v organskih topilih ter ne-higroskopen. Vodne raztopine pululana so stabilne in imajo relativno nizko viskoznost v primerjavi z raztopinami drugih polisaharidov. Kot užiten, netoksičen in biorazgradljiv polimer nudi številne možnosti za rabo v živilski in farmacevtski industriji (Leathers, 2003; Singh in sod., 2008).



Slika 5: Kemijska struktura pululana s ponavljajočimi se enotami maltotrioze (Singh in sod., 2008).
Figure 5: Chemical structure of pullulan with repeating units of maltotriose (Singh et al., 2008).

2.1.2 Metode kapsulacije

Različne tehnike kapsulacije imajo skupne tri glavne korake: nastanek jedra in tvorba ovoja okrog jedrne snovi, preprečitev nezaželenega puščanja jedrne snovi ter preprečitev vstopa nezaželenih snovi v notranjost kapsule (Gibbs in sod., 1999). Metode kapsulacije lahko temeljijo na fizikalnih pojavih ali kemijskih reakcijah, mnoge pa izkoriščajo tako fizikalne kot kemijske procese (Zvonar in Gašperlin, 2011).

2.1.2.1 Kapsulacija z razprševanjem

Kapsulacija z razprševanjem temelji na raztapljanju, emulgiranju ali dispergiranju aktivne snovi v vodni raztopini nosilnega polimera, čemur sledi razprševanje v obliki drobnih kapljic v komoro s krožečim vročim in suhim zrakom. V sušilni komori molekule vode izhlapijo, medtem pa se molekule aktivne snovi vključijo med verige nosilnega polimera, ki tvorijo ogrodje. Nastali delci so v obliki večjedrnih mikrosfer, velikih od 10 do 150 μm . Kadar razpršujemo skozi dvokanalno šobo, lahko dobimo kapsule z jedrom in ovojnico. S kontroliranjem parametrov procesa, kot so temperatura vstopnega zraka, hitrost pretoka, temperatura vstopne tekočine in hitrost razprševanja, je mogoče zagotoviti, da temperatura kapljic ne preseže 100 °C. To je pomembno zlasti v primeru kapsulacije toplotno občutljivih in hlapnih snovi, kot so predvsem antioksidanti in arome.

Nosilni materiali, ki se pogosto uporabljajo za sušenje z razprševanjem, so naravni hidrokoloide (arabski gumi, alginat, karagenan), proteini (proteini sirotke, sojini proteini, želatina), ogljikovi hidrati (maltodekstrin, derivati celuloze) in lipidi (voski, emulgatorji). Mikrokapsule, pripravljene z metodo sušenja z razprševanjem, običajno sprostijo svojo vsebino takoj ob dodatku vode, čeprav je z uporabo bolj hidrofobnih ali zamreženih nosilnih polimerov moč doseči tudi postopno sproščanje jedrnih komponent (Gouin, 2004; Gharsallaoui in sod., 2007).

2.1.2.2 Oblaganje z razprševanjem

Pri oblaganju z razprševanjem na jedro snov, ki je v obliki trdnih delcev in s pomočjo zračnega toka kroži v komori za oblaganje, pršimo koloidno raztopino ali suspenzijo nosilnega materiala. Topilo iz raztopine nosilnega materiala zaradi toplega zraka v komori izpari in posledično molekule nosilca na površini jedrnih delcev tvorijo ovojnico. Nastale mikrokapsule so velike od 0,1 do 10 μm in običajno vsebujejo od 5 do 50 % nosilnega polimera. Kot nosilni materiali se običajno uporabljajo derivati celuloze, dekstrini, proteini, gumiji in derivati škroba. Pogosta oblika komore za oblaganje z razprševanjem je Würsterjeva komora, kjer nosilni material razpršujemo iz dna komore. Na ta način zmanjšamo razdaljo med jedrnimi delci in kapljicami nosilca in preprečimo, da bi se kapljice nosilne raztopine posušile, še preden dosežejo jedrni material (Guignon in sod., 2007).

Poleg omenjenih materialov se za oblaganje z razprševanjem lahko uporabljajo tudi taline (npr. hidrogenirana rastlinska olja, maščobne kisline, emulgatorji in voski). V tem primeru strjevanje nosilnega materiala na površini jedrnih delcev dosežemo tako, da v komoro dovajamo ohlajen zrak (10 do 20 $^{\circ}\text{C}$ pod temperaturo tališča nosilca) (Zuidam in Shimoni, 2010).

2.1.2.3 Razprševanje s strjevanjem

Razprševanje s strjevanjem (angl. »spray cooling«, »spray chilling« in »spray congealing«) se uporablja za kapsulacijo aktivnih snovi v lipide. Disperzijo staljenih lipidov z aktivno komponento razpršujemo v hladilno komoro, kjer pride do strjevanje lipidov in nastanka sfer. Princip kapsulacije je zelo podoben postopku sušenja z razprševanjem, le da razprševanje talin izvajamo v ohlajen zrak ali inerten plin. Voda v procesu ni potrebna, zato ne prihaja do izhlapevanja vode. Pri procesu razprševanja s strjevanjem jedrne komponente niso izpostavljene visokim temperaturam, kar je pomembno v primeru kapsulacije toplotno občutljivih snovi, kot so omega-3 maščobne kisline, probiotiki in encimi. Kot nosilni materiali se običajno uporabljajo maščobne kisline in maščobni alkoholi, triacilgliceridi in

woski, ki imajo temperaturo taljenja višjo od 25 °C. Nastali delci imajo hidrofobne lastnosti, kar lahko otežuje vgrajevanje hidrofilnih aktivnih komponent (Okuro in sod., 2013).

2.1.2.4 Mikrokapsulacija z iztiskanjem talin

Mikrokapsulacija z iztiskanjem taline temelji na taljenju nosilnega materiala pri temperaturah nad 100 °C. Talino, v kateri je dispergirana ali raztopljena jedrna snov, potiskamo skozi eno ali več šob. Po ohlajanju se iztisnjena mešanica ponovno strdi, jedrna snov pa ostane ujeta v notranjosti nastalih delcev. Materiali, ki se uporabljajo pri mikrokapsulaciji z iztiskanjem talin, so saharoza, maltodekstrin, glukozni sirup, polioli, različni mono- in di-saharidi, škrob in modificiran škrob, celulozni etri, proteini, emulgatorji, lipidi in gumiji. Nastali delci so običajno relativno veliki (od 500 do 1000 µm) in v obliki pelet (Zuidam in Shimoni, 2010).

2.1.2.5 Emulzifikacija

Emulzije so sestavljene iz dveh faz, ki se med seboj ne mešata. Emulzije so termodinamsko nestabilne in težijo k ločitvi faz. Stabilnost emulzije lahko povečamo s primerno sestavo obeh faz ter z uporabo emulgatorjev. Emulzije se formirajo pod vplivom visokih strižnih sil. Za pripravo emulzij se uporabljajo naprave, kot so rotor-stator homogenizator, koloidni mlin, mešalec z visokimi strižnimi silami ali posoda za mešanje z vgrajenimi membranskimi sistemi, skozi katere potiskamo jedrno snov v zunanjo fazo.

Emulzije so uporabne za kapsulacijo tako vodotopnih kot lipofilnih snovi. Vodotopne snovi lahko kapsuliramo v emulzijo vode-v-olju (v/o) ali pa v dvojno emulzijo voda-v-olju-v-vodi (v/o/v), medtem ko se za kapsulacijo lipofilnih snovi (npr. arome, karotenoidi, rastlinski steroli in vitamin E) večinoma uporabljajo emulzije olja-v-vodi (o/v). Emulzije olja-v-vodi lahko sušimo s postopkom sušenja z razprševanjem ali z liofilizacijo in tako dobimo končni produkt v obliki prahu (Appelquist in sod., 2007; Zuidam in Shimoni, 2010).

2.1.2.6 Oblaganje plast-na-plast

Metoda kapsulacije z oblaganjem plast-na-plast temelji na zaporedni adsorpciji nasprotno nabitih polielektrolitov na delce jedrne snovi. Prva plast obloge se veže neposredno na površino jedrnih delcev, zato morajo imeti le ti ustrezen naboje. Po nanosu prve plasti se poveča površinska funkcionalnost jedrnih delcev, kar omogoča vezavo naslednje plasti nasprotno nabitega elektrolita. Izpostavljanje delcev raztopinam nasprotno nabitih elektrolitov ponavljamo, dokler ne dobimo obloge z želenim številom polielektrolitskih plasti. Za oblaganje se uporabljajo kationski polielektroliti, npr. hitozan in želatina, ter anionski

polielektroliti, npr. karboksimetilceluloza, dekstran sulfat, pektin in alginat (Dolenc in Kristl, 2008).

2.1.2.7 Koacervacija

Koacervacija je pojav, pri katerem pride do ločitve faz homogene raztopine polimera v s polimerom bogato fazo (koacervat) in v s polimerom revno fazo. Ločimo enostavno in kompleksno koacervacijo. V obeh primerih gre za enak mehanizem kapsulacije, ki se razlikuje le v načinu, po katerem pride do separacije faz. Pri enostavni koacervaciji zmanjšamo topnost polimera npr. z dodatkom visoko koncentrirane raztopine soli, organskega topila, s spremembo pH ali z zniževanjem temperature (Zvonar in Gašperlin, 2011). Pri kompleksni koacervaciji pride do tvorbe kompleksov med dvema nasprotno nabitima polimeroma.

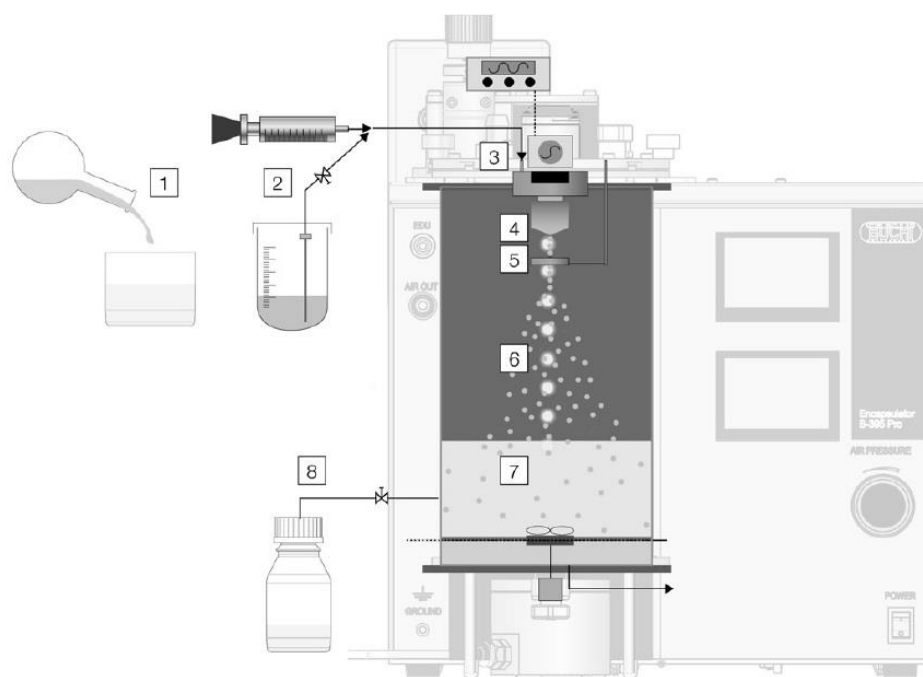
Kompleksna koacervacija vključuje tri glavne korake: 1) priprava disperzije ali emulzije, 2) kapsulacija jedrne snovi in 3) stabilizacija nastalih delcev. Najprej jedrno snov, običajno olje, dispergiramo v raztopini polimera (npr. vodna raztopina kationskega polimera), nato v disperzijo dodamo drugi polimer (vodna raztopina anionskega polimera). Z dodatkom soli ali s spremembo pH in temperature sprožimo nastanek kompleksov med obema polimeroma, ki se odlagajo na površini jedrnih delcev in tako tvorijo ovojnico. Sledi stabilizacija ovojnice s premreževalnimi sredstvi ali toplotno obdelavo. Kot kationski polimer se pri kompleksni koacervaciji pogosto uporabljajo želatina in proteini sirotke, kot anionski polimer pa arabski gumi, karboksimetil celuloza, pektin, karagenan, alginat in polifosfati (Gosh, 2006).

2.1.2.8 Kapsulacija s kapljalno metodo in premreževanjem

Kapsulacija s kapljalno metodo temelji na kapljanju raztopine nosilnega polimera z raztopljeno ali suspendirano aktivno snovjo v vodno raztopino premreževalnega sredstva. Pri tem se uporabljajo različne tehnike kapljanja, ki omogočajo večji donos, nastanek manjših delcev ter enakomerno velikost delcev. Npr. sistemi, kjer koaksialni tok zraka na mestu šobe povzroči nastanke strižnih sil ter posledično odlepi kapljico iz šobe (angl. »AirJet«), omogočajo nastanek delcev s premerom od 300 do 1000 μm . S podobnim namenom se uporablja tudi električno polje, ki potegne kapljice s šobe v premreževalno sredstvo ter omogoča nastanek delcev, velikih od 50 do 1000 μm (Shilpa in sod., 2003). Pri tehniki z vibrirajočo komoro (slika 6) je nad šobo kapsulatorja nameščena komora, ki niha z določeno frekvenco in povzroča razbitje ekstrudiranega curka polimera v okrogle, enako velike kapljice. Pod šobo je nameščena posebna elektroda, ki dovaja negativni naboj na površino kapljic in s tem preprečuje, da bi se le te med padanjem v premreževalno raztopino zlepljale. Omenjena tehnika omogoča nastanek delcev, velikih od 150 do 2000 μm (Whelehan in

Marison, 2011). Pri tehniki prekinitve curka (angl. »laminar jet break-up«) gre za mehansko prekinjanje curka polimera v enako velike segmente, iz katerih se na podlagi površinske napetosti tvorijo kapljice oziroma sferični delci, veliki od 120 do 3000 μm (Prüße in sod., 1998). Tako tehnika z vibrirajočo komoro kot tehnika mehanske prekinitve curka sta poleg laboratorijske produkcije mikrokapsul primerni tudi za produkcijo mikrokapsul v industrijskem merilu (Zuidam in Shimoni, 2010).

Z uporabo dvojne koncentrične šobe lahko z metodo kapljanja pripravimo mikrokapsule, kjer je jedrna faza dodatno obdana z definirano ovojnico. Jedro (mikro)kapsul je lahko hidrofilno ali hidrofobno, prav tako ovojnica, ki je lahko iz polisaharidov in nastane na podlagi ionotropnega geliranja (npr. kalcijev-alginat, kalijev-karagenan) ali iz želatine (Zuidam in Shimoni, 2010).



Slika 6: Shematski prikaz kapsulatorja z vibrirajočo komoro. 1 – mešanica aktivne komponente in nosilnega polimera, 2 – črpanje mešanice z injekcijsko brizgo ali z zračno črpalko, 3 – vibrirajoča komora, 4 – tvorba kapljic na šobi kapsulatorja, 5 – elektroda, ki dovaja negativni naboj na površino kapljic, 6 – stroboskopska luč omogoča opazovanje tvorbe kapljic, 7 – nastajanje delcev v utrjevalni raztopini, 8 – zbiranje nastalih delcev (Encapsulator B-390/B-395 Pro Technical data sheet, 2015).

Figure 6: Schematic representation of encapsulator with vibrating chamber. 1 – polymer and bioactive compound mixture, 2 – pumping of the mixture with syringe or air pump, 3 – vibrating chamber, 4 – droplet formation at the encapsulator nozzle, 5 – electrostatic charge of the droplets and dispersion of droplets, 6 – stroboscopic light that enables online process control of droplet formation, 7 – formation of particles in the hardening bath, 8 – collection of the particles (Encapsulator B-390/B-395 Pro Technical data sheet, 2015).

2.1.2.9 Kapsulacija z metodo emulgiranja in premreževanja notranje faze

Z uporabo različnih emulzijskih metod lahko vodotopne spojine vgradimo v vodotopen polimer oziroma makromolekulo (npr. želatina, alginat, pektin, albumin ali hitozan) tako, da obe komponenti raztopimo v vodni fazi, ki jo nato dispergiramo v lipofilni fazi (emulzija V/O). V kolikor želimo vgraditi hidrofobne spojine v vodotopen polimer, pripravimo dvojno emulzijo tipa O/V/O. Izdelavi emulzije v obeh primerih sledi utrjevanje dispergiranih kapljic. Hidrofilen polimer lahko utrdimo z ustreznim postopkom premreževanja (npr. termično ali kemijsko premreženje, ionotropno geliranje, tvorba interpolimernih kompleksov in koacervatov) (Zvonar in Kristl, 2012). V primeru priprave alginatnih mikrokapsul obstaja več načinov geliranja alginatnih kapljic v oljni fazi. Emulziji raztopine alginata v olju lahko dodamo raztopino CaCl_2 in na ta način sprožimo premreževanje alginatnih kapljic ter hkrati ločitev oljne in vodne faze (Monshipouri in Rudolph, 1995; You in Peng, 2005). Drug način eksterne geliranja alginatnih kapljic opisujejo Paques in sod. (2012), ki so alginatne kapljice v olju gelirali z nanodelci CaCl_2 . Nanodelce CaCl_2 so pripravili tako, da so etanolno raztopino CaCl_2 emulgirali v olju ter nato odparili etanol. Emulzijo alginata v olju so združili z emulzijo nanodelcev CaCl_2 v olju ter z mešanjem omogočili adsorpcijo nanodelcev CaCl_2 na površino alginatnih kapljic, kar je povzročilo geliranje alginata in nastanek mikrokapsul. Končni alginatni delci v tem primeru nastanejo v oljni fazi.

Alternativo eksterne geliranju alginatnih kapljic predstavlja interno geliranje. V tem primeru raztopino alginata, ki vsebuje vir netopnega kalcija (npr. CaCO_3), emulgiramo v oljni fazi. V emulzijo dodamo ustrezno kislino, ki je topna v olju in povzroči znižanje pH v notranjosti alginatnih kapljic. V kislem mediju pride do sproščanja ionov Ca^{2+} iz sicer netopne soli ter do geliranja alginatnih kapljic (Reis in sod., 2007). Paques in sod. (2014a) so opisali pripravo alginatnih mikrokapsul z metodo internega geliranja v enem samem koraku. Alginatno raztopino, ki je vsebovala nanodelce CaCO_3 in glukonodelta lakton, so emulgirali v oljni fazi. Glukonodelta lakton je pri tem hidroliziral v glukonsko kislino, kar je povzročilo znižanje pH in posledično raztapljanje CaCO_3 ter geliranje alginatnih kapljic.

Metoda emulgiranja omogoča pripravo delcev submikrometrskih velikosti (Paques in sod., 2013), kar je ena izmed prednosti v primerjavi z metodo kapljanja, ki običajno omogoča pripravo delcev, velikih od 200 do 1000 μm . Poleg tega je proces priprave emulzij relativno enostaven in omogoča proizvodnjo mikrokapsul v industrijskem merilu. Pri metodi kapljanja je za povečanje proizvodnje potrebno veliko število šob, kar pogosto sovпада z operativnimi težavami, kot so mašenje šob ter zahtevno čiščenje (Paques in sod., 2014b). Slabost priprave mikrokapsul z metodo emulgiranja je, da se končni delci pogosto nahajajo v oljni fazi in je potrebno vpeljati dodatne korake za odstranjevanje in ponovno uporabo olja ter ustrezno spiranje delcev, ki pogosto vključuje rabo nezaželenih organskih topil (Zuidam in Shimoni, 2010).

2.1.2.10 Molekulska inkluzija

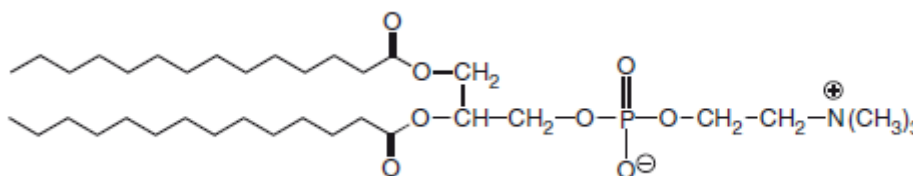
Molekulska inkluzija temelji na vezavi jedrne snovi v molekule ogrodnega materiala, ki jih običajno predstavljajo ciklodekstrini. Ciklodekstrini so naravni ciklični oligosaharidi, ki jih pridobivamo iz škroba. Sestavljeni so iz 6, 7 ali 8 glukočnih ostankov in jih glede na to uvrščamo med α -, β - ali γ -ciklodekstrine, od katerih se najpogosteje uporablja β -ciklodekstrin. Glukočni ostanki ciklodekstrinov so med seboj povezani z α -(1 \rightarrow 4) glikozidnimi vezmi in tvorijo strukturo v obliki cilindra. Zunanji del molekule ciklodekstrina je hidrofilen, medtem ko je notranjost cilindra hidrofobna. Takšna struktura omogoča vezavo manj polarnih snovi (npr. esencialne maščobne kisline, arome) v notranjost cilindra na podlagi hidrofobnih interakcij (Fang in Bhandari, 2010).

Kapsulacija v ciklodekstrine običajno poteka v vodni raztopini, kjer pride do ko-precipitacije kompleksov jedrne snovi in ciklodekstrina. Poleg tega kapsulacija lahko poteka tudi v vodni suspenziji delno raztopljenega ciklodekstrina (do 45 % (m/m) ciklodekstrina v vodi), v pasti ciklodekstrina z 20-30 % vode ali med suhim mešanjem ciklodekstrina in jedrne spojine (Hedges, 1998).

Manj pogosti primeri molekulske inkluzije temeljijo na kapsulaciji lipidov v molekule amiloze ter na uporabi β -laktoglobulinov, ki imajo hidrofobne žepe in omogočajo vezavo maščobnih kislin in arom (Zuidam in Shimoni, 2010).

2.1.2.11 Kapsulacija v liposome

Liposomi so vezikli, sestavljeni iz enega ali več lipidnih dvoslojev. Mehanizem nastanka temelji na hidrofilnih interakcijah med polarnimi deli fosfolipidov in molekulami vode ter hidrofobnimi interakcijami nepolarnih verig fosfolipidov. Osnovna struktura enega najpogostejših fosfolipidov, fosfatidilholina, je prikazana na sliki 7. Fosfatidilholin vsebujejo 2 dolgi verigi maščobnih kislin, vezani na molekulo glicerola. Tretja hidroksilna skupina glicerola je modificirana s fosforno kislino, ki je vezana na holin.



Slika 7: Kemijska struktura fosfatidilholina (Wandrey in sod., 2010).

Figure 7: Chemical structure of phosphatidylcholine (Wandrey et al., 2010).

Fosfolipidi so ionske amfifilne molekule ter delujejo kot dobri emulgatorji in disperzna sredstva. Ob mešanju z vodo se uredijo v dobro organizirane strukture in dvosloje. Dovajanje energije med mešanjem lipidov z vodo omogoči nastanek liposomov, ki sicer ne nastanejo spontano. V liposomih je jedro iz vodne faze z enim ali več fosfolipidnimi dvosloji ločeno od zunanje vodne faze (slika 8). Jedrne snovi se glede na njihov značaj med nastajanjem liposomov lahko ujamejo v hidrofilno notranjost liposomov, lahko se vgradijo v fosfolipidni dvosloj ali pa se vežejo na njegovo površino. Ena ključnih lastnosti liposomov je temperatura faznega prehoda iz gel stanja v stanje tekočega kristala, kjer zaradi taljenja acilnih verig pride do zmanjšanja urejenosti fosfolipidnega dvosloja. V bližini ali nad temperaturo faznega prehoda lahko pride do hitrega sproščanja vsebine liposomov v okoljsko raztopino. Lastnosti liposomov so odvisne tudi od dejavnikov, kot so pH in ionska jakost okoljske raztopine (Wandrey in sod., 2010).

V živilski industriji je najbolj razširjena uporaba velikih enoslojnih veziklov (40-1000 nm), ki so relativno stabilni in omogočajo visoko učinkovitost kapsulacije. Prednost liposomov pred ostalimi metodami kapsulacije je, da nudijo dobro zaščito vodotopnih snovi v vodnem okolju. Mikrokapsule, pripravljene z metodami, kot so npr. sušenje z razprševanjem, oblaganje z razprševanjem in ekstruzija, v suhi obliki nudijo dobro zaščito jedrnih komponent, medtem ko ob dodatku vode takoj sprostijo svojo vsebino (Gouin, 2004).



Slika 8: Shematski prikaz strukture liposoma (Wandrey in sod., 2010).

Figure 8: Schematic representation of liposome structure (Wandrey et al., 2010).

2.1.2.12 Kapsulacija s superkritičnimi fluidi

Superkritični fluidi obstajajo nad kritično temperaturo in tlakom in imajo lastnosti tako plinov kot tekočin. Njihova gostota je podobna tekočinam, po viskoznosti in stisljivosti so podobni plinom, medtem ko sta difuzivnost in prenos mase večja kot pri tekočinah. V superkritično stanje je mogoče privedi različne snovi, npr. vodo, dušik, propan in ogljikov dioksid. Slednji se v živilski industriji uporablja najpogosteje. Z metodo kapsulacije s superkritičnimi fluidi se pogosto kapsulirajo vitamini, arome in barvila, kot ogrodni materiali pa se uporabljajo snovi, ki se raztapljajo (npr. voski) ali ne raztapljajo (proteini, polisaharidi) v superkritičnem ogljikovem dioksidu. Najpogostejši metodi kapsulacije s superkritičnimi fluidi sta hitro razširjanje superkritičnih raztopin (angl. »Rapid Expansion of Supercritical Solutions«; RESS) in metoda s superkritičnim fluidom kot netopilom (angl. »Supercritical Fluid Anti-Solvent«; SAS) (Zvonar in Gašperlin, 2011).

Pri metodi s hitrim razširjanjem superkritičnih raztopin sta tako jedrna snov kot nosilni material raztopljeni v superkritičnem fluidu pod visokim pritiskom. Mešanico nato skozi ozko šobo razpršimo v komoro z atmosferskim tlakom. Pri tem pride do obarjanja nosilnega materiala, ki se začne odlagati na površino jedrnih delcev v obliki ovojnice.

Pri metodi s superkritičnim fluidom kot netopilom sta nosilni material in jedrna spojina raztopljeni v ustreznem topilu pri visokem tlaku. V raztopino dovedemo superkritični fluid, ki povzroči ekspanzijo volumna raztopine ter posledično supersaturacijo in obarjanje topljencev. Pri tem se molekule nosilca odlagajo na površini jedrnih delcev bioaktivne snovi in tvorijo ovojnico novo nastalih mikrokapsul (Gosh, 2006).

2.2 POLIFENOLNE SPOJINE

Polifenolne spojine so sekundarni metaboliti rastlin, ki med drugim sodelujejo pri obrambi rastlin pred ultravijoličnim sevanjem in napadom patogenov. V naravi je identificiranih več tisoč polifenolnih spojin, od teh se jih več sto nahaja v užitnih rastlinah. Za polifenolne spojine je značilna struktura, ki vključuje eno ali več hidroksilnih skupin vezanih na aromatske obročje (Manach, 2004). Na podlagi števila fenolnih obročev ter strukturnih elementov, ki povezujejo te obročje med seboj, delimo fenolne spojine na skupine, ki so prikazane v preglednici 2.

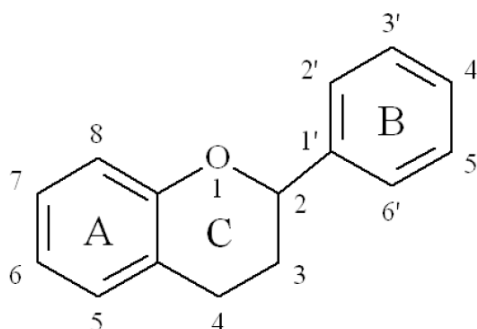
Fenolne spojine, ki so najbolj zastopane v prehrani, so fenolne kisline, flavonoidi in tanini. Fenolne kisline vključujejo hidroksibenzojske kisline (galna kislina, p-hidroksibenzojska kislina, protokatehnična kislina, vanilna kislina in siringinska kislina) in hidroksicimetne kisline (kavna kislina, ferulna kislina, p-kumarna kislina in sinapinska kislina) (Balasundram in sod., 2006).

Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin (Balasundram in sod., 2006).

Table 2: Classes of phenolic compounds (Balasundram et al., 2006).

Skupina polifenolnih spojin	Struktura
Enostavni fenoli, benzokinoni	C ₆
Hidroksibenzojske kisline	C ₆ -C ₁
Acetofenoni, fenilacetne kisline	C ₆ -C ₂
Hidroksicimetne kisline, fenilpropanoidi (kumarini, izokumarini, kromoni, kromeni)	C ₆ -C ₃
Naftokinoni	C ₆ -C ₄
Ksantoni	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stilbeni, antrakinoni	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoidi, izoflavonoidi	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignani, neolignani	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoidi	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Lignini	(C ₆ -C ₃) _n
Kondenzirani tanini (proantocijanidini ali flavolani)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Flavonoidi imajo značilno strukturo iz dveh aromatskih obročev (A in B), ki sta med seboj povezana s tremi atomi ogljika, ki tvorijo oksigeniran heterociklični obroč (C) (slika 9) (Manach, 2004).



Slika 9: Osnovna struktura flavonoida (Thilakarathna in Rupasinghe, 2013).

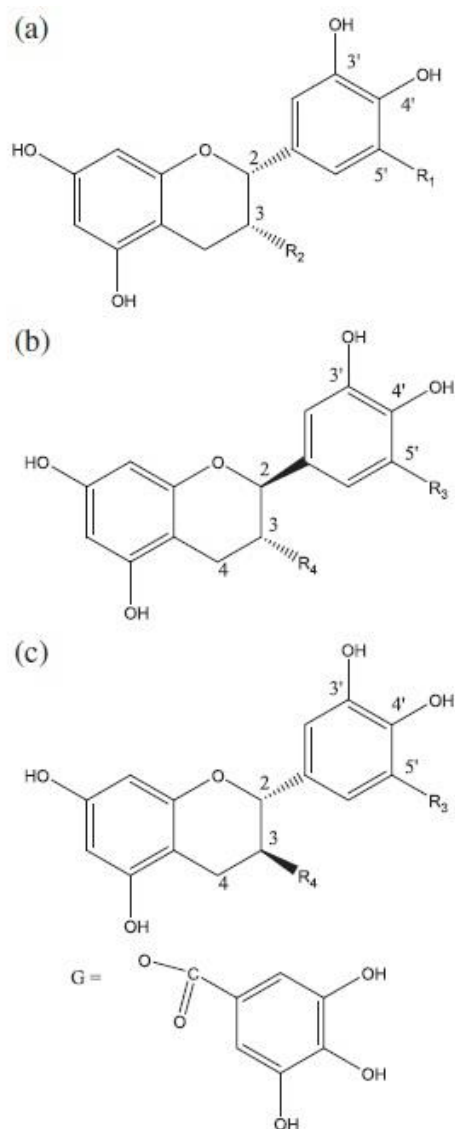
Figure 9: Basic flavonoid structure (Thilakarathna and Rupasinghe, 2013).

Glede na obroč C flavonoide delimo na flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocijanidine in flavanole (katehini in proantocijanidini). Večina flavonoidov, z izjemo flavanolov, obstaja v obliki glikozidov (Thilakarathna in Rupasinghe, 2013), poleg tega so flavonoidi lahko povezani z različnimi organskimi kislinami ali med seboj (Manach, 2004). Najpogostejša skupina flavonoidov v prehrani so flavanoli, ki jih najdemo v številnih vrstah sadja, zelenjave, žit in zdravilnih zelišč ter se pogosto uporabljajo kot prehranski dodatki ali kot funkcionalna sestavina pijač in mlečnih izdelkov.

Tanini predstavljajo tretjo skupino najbolj pogostih fenolnih spojin. Delimo jih na hidrolizajoče tanine, ki so estri galne kisline (galo- in elagitanini), in kondenzirajoče tanine oziroma proantocijanidine, ki so polimeri polihidroksiflavan-3-ola (Balasundram in sod., 2006).

2.2.1 Katehini

Bogat vir polifenolnih spojin predstavlja zeleni čaj (*Camellia sinensis*), ki vsebuje 300-400 mg/g flavanolorov (Dubick in Omaye, 2007). Katehini imajo največjo antioksidativno aktivnost v primerjavi z ostalimi polifenolnimi spojinami v zelenem čaju. Najbolj zastopani katehini so: (–)-epigalokatehin-3-galat (EGCG), (–)-epikatehin-3-galat, (–)-epigalokatehin in (–)-epikatehin. Epikatehini lahko spremenijo epimerno strukturo v ne-epikatehine: (–)-galokatehin-3-galat, (–)-katehin-3-galat, (–)-galokatehin in (±)-katehin (slika 10). Izmed katehinov EGCG izkazuje največjo bioaktivnostjo in pogosto služi kot indikator kvalitete zelenega čaja (Ananingsih in sod., 2013). Poleg zelenega čaja vir katehinov predstavljajo tudi sadje (jabolka, marelice, robide, češnje, grozdje, breskve, maline, jagode), stročnice (fižol), črni čaj, jabolčno vino, rdeče vino in čokolada. Pri tem v sadju redko najdemo galne estre katehinov; v nizkih količinah so prisotni le v jagodičevju, črnem ribezu ter grozdju (Gadkari in Balaraman, 2014).



Katehin	R1	R2	R3	R4
(-)-EGCG	OH	G	-	-
(-)-epikatehin galat	H	G	-	-
(-)-epigalokatehin	OH	OH	-	-
(-)-epikatehin	H	OH	-	-
(-)-galokatehin galat	-	-	OH	G
(-)-galokatehin	-	-	OH	OH
(-)-katehin galat	-	-	H	G
(±)-katehin	-	-	H	OH

Slika 10: Kemijske strukture katehinov iz zelenega čaja: epikatehini (a), katehini (b) in (±)-katehin (c). G – galna kislina (Ananingsih in sod., 2013).

Figure 10: Chemical structures of green tea catechins: epicatechin (a), catechin (b) and (±)-catechin (c). G – gallic acid (Ananingsih et al., 2013).

2.2.1.1 Antioksidativno delovanje katehinov

Zeleni čaj oziroma katehini iz zelenega čaja so najbolj poznani po svojem antioksidativnem delovanju ter posledično po zaščitni vlogi pred boleznimi, ki so povezane s prisotnostjo reaktivnih kisikovih zvrsti, npr. rak, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni (preglednica 3) (Zaveri, 2006).

Preglednica 3: Delovanje katehinov pri zdravljenju oziroma zaviranju nekaterih bolezni (Zaveri, 2006).

Table 3: Biological properties of catechins for treatment and prevention of diseases (Zaveri, 2006).

Bolezen	Delovanje katehinov
Staranje in nevrodegenerativne bolezni	Z antioksidativnim delovanjem in vezavo železa ščitijo organe pred poškodbami staranja, zavirajo Parkinsonovo in Alzheimerjevo bolezen ter pojav kapi.
Kardiovaskularne bolezni	Zavirajo oksidacijo lipoproteinov z nizko gostoto (LDL) in razvoj aterosklerotičnih plakov; zavirajo povišanje krvnega tlaka.
Debelost	Uživanje EGCG pomaga pri zniževanju telesne teže.
Diabetes	Povečajo občutljivost na inzulin, zavirajo razvoj odpornosti proti inzulinu in hiperglikemijo.
Rak	Zaradi antioksidativnega, antiproliferativnega in pro-apoptičnega delovanja v živalskih modelih zavirajo karcinogenezo na vseh nivojih (inicijacija, promocija in progresija).
Virusne in bakterijske okužbe	Zavirajo zobni karies; EGCG zavira okužbo s HIV in s proti meticilinu odpornimi bakterijami vrste <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).

Sposobnost lovljenja prostih radikalov določene spojine je povezana z njenim redukcijskim potencialom. Nižji redukcijski potencial pomeni, da je za oddajo vodika oziroma elektrona potrebna nižja energija. EGCG in (–)-epigalokatehin imata nižji redukcijski potencial oziroma sta boljša donorja elektronov kot vitamin E, medtem ko ima vitamin C še nižji redukcijski potencial ter je s tem boljši donor elektronov kot katerikoli katehin iz zelenega čaja (preglednica 4). Pri preučevanju antioksidativne aktivnosti katehinov *in vitro* z metodo TEAC (angl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), kjer se antioksidativna aktivnost spojin izraža v ekvivalentih antioksidativne kapacitete troloksa (vodotopni analog vitamina E), pa se je izkazalo, da so katehini ter zeleni in črni čaj bolj učinkoviti pri redukciji radikala ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) kot vitamin E in vitamin C (Higdon in Frei, 2010).

Preglednica 4: Redukcijski potenciali in antioksidativne aktivnosti izbranih katehinov v primerjavi z zelenim in črnim čajem ter vitaminoma E in C (Higdon in Frei, 2010).

Table 4: Reduction potential and antioxidant activity of selected catechins in comparison to green and black tea and vitamins E and C (Higdon and Frei, 2010).

Antioksidant	Redukcijski potencial (V) ^a	Antioksidativna aktivnost (mM) ^b
(-)-epikatehin	0,57	2,4 ± 0,02
(-)-epigalokatehin	0,43	3,8 ± 0,06
(-)-epikatehin-3-galat	0,55	4,9 ± 0,02
EGCG	0,43	4,8 ± 0,06
Zeleni čaj (1000 ppm)	-	3,8 ± 0,03
Črni čaj (1000 ppm)	-	3,5 ± 0,03
Vitamin E	0,48	1,0 ± 0,03
Vitamin C	0,28	1,0 ± 0,02

^a Redukcijski potencial pri pH 7 in 20 °C

^b TEAC (troloks ekvivalenti antioksidativne kapacitete)

Z antioksidativnim delovanjem katehinov povezujejo več struktur, vendar natančni mehanizmi še niso poznani. Pri vseh katehinih je prisotna orto-dihidroksilna skupina (o-3',4'-OH) na obroču B, ki sodeluje pri delokalizaciji elektronov ter stabilizaciji radikalske oblike. Galokatehini ((-)-epigalokatehin in EGCG) imajo trihidroksilno skupino na obroču B (3',4',5'-OH), katehin galati ((-)-epikatehin-3-galat in EGCG) pa imajo na poziciji 3' obroča C z estrsko vezjo vezan galatni ostanek in s tem tri dodatne OH skupine. Prisotnost 3',4',5'-OH in galatnega ostanka hkrati je povezana s povečano antioksidativno aktivnostjo (Valcic in sod., 1999).

2.2.1.2 Protimikrobno delovanje katehinov

Katehini iz zelenega čaja dokazano zavirajo rast tako grampozitivnih kot gramnegativnih bakterij. Občutljivost različnih bakterijskih vrst na katehine je povezana z razlikami v sestavini celičnih sten (Perumalla in Hettiarachchy, 2011). Yoda in sod. (2004) so preučevali protimikrobno učinkovitost EGCG na različne bakterijske vrste rodu *Staphylococcus* (grampozitivni koki) ter na gramnegativne bacile, kot so *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* in *Salmonella*. Pokazali so, da je bila za inhibicijo rasti stafilokokov potrebna koncentracija EGCG 50-100 µg/ml, medtem ko so bile za inhibicijo rasti gramnegativnih bacilov potrebne koncentracije, višje od 800 µg/ml.

Med katehini imata največjo protimikrobno učinkovitost EGCG in (-)-epikatehin-3-galat. Prisotnost ostanka galne kisline je namreč odgovorna za visoko afiniteto do lipidnih membran, ki so glavne tarče delovanja protimikrobnih snovi. Katehini lahko delujejo na membrane bakterijskih celic na več načinov: 1) povzročijo fizične okvare membrane, 2) zmanjšajo protonsko motorno silo ali 3) inhibirajo aktivnost membransko vezanih encimov (Perumalla in Hettiarachchy, 2011).

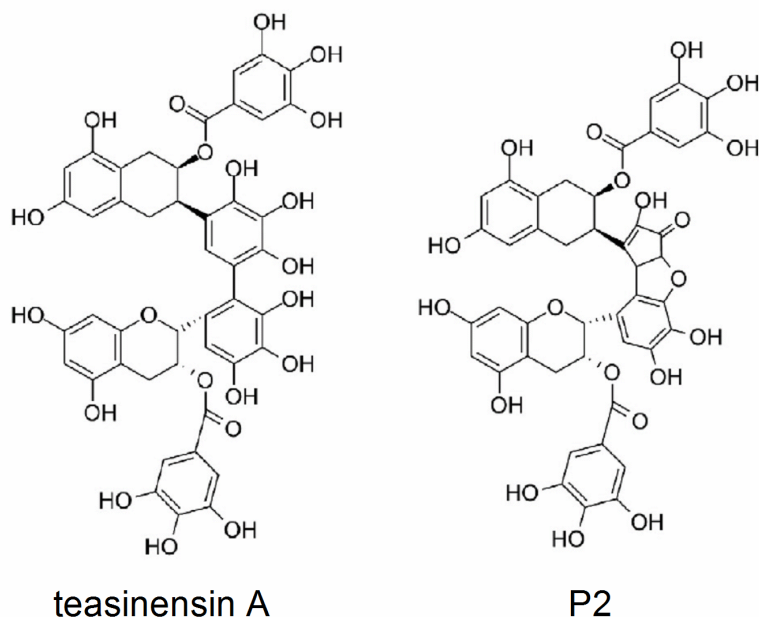
2.2.1.3 Katehini v živilstvu

Medtem ko so številni pozitivni učinki katehinov za zdravje ljudi že obsežno opisani v literaturi (Higdon in Frei, 2010), se zadnja leta kaže vse več zanimanja za rabo rastlinskih izvlečkov kot alternativo sintetičnim antioksidantom in protimikrobnim sredstvom v živilih. Z dodatkom naravnih polifenolnih spojin živilom bi lahko preprečili rast patogenih mikroorganizmov ter oksidacijo lipidov in s tem podaljšali rok trajanja živil.

Delovanje izvlečkov zelenega čaja so testirali v različnih živil. Tang in sod. (2001) so pokazali, da je dodatek katehinov v koncentraciji 300 mg/kg preprečil oksidacijo lipidov v rdečem mesu in perutninskih pleskavicah. Za preprečevanje oksidacije lipidov v vzorcih z visoko vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin, kot so ribe, so bile potrebne koncentracije katehinov, višje od 300 mg/kg. Chu in Hsu (1999) sta pokazala, da je (\pm)-katehin značilno povečal stabilnost arašidovega olja v primerjavi z rožmarinom, tokoferolom, fosfolipidi in askorbil palmitatom, medtem ko sta Chen in Chan (1996) pokazala, da čajni izvleček, bogat z ($-$)-epikatehinom, EGCG, ($-$)-epigalokatehinom in ($-$)-epikatehin-3-galatom, deluje kot boljši antioksidant v repičnem olju v primerjavi s sintetičnim butiliranim hidroksitoluenom.

2.2.1.4 Stabilnost katehinov

Na stabilnost katehinov vplivajo dejavniki, kot so pH, temperatura, količina kisika, prisotnost antioksidantov, kovinskih ionov in drugih snovi ter koncentracija katehinov. Epikatehini, ki so jih identificirali v zelenem čaju, so v »cis« strukturi in lahko pod vplivom povišane temperature preidejo v »trans« izomere, ne-epikatehine. Epimerizacija katehinov je reverzibilna. S poviševanjem temperature se zmanjšuje koncentracija epikatehinov in povečuje koncentracije njihovih izomer, sčasoma pa ob zviševanju temperature pride do zmanjševanja koncentracije celokupnih katehinov (Wang in sod., 2008). V vodnih raztopinah s $\text{pH} \leq 4,0$ so katehini kemijsko stabilni, medtem ko so v raztopinah s $\text{pH} \geq 6,0$ podvrženi razgradnji (Ananingsih in sod., 2013). EGCG je podvržen avtooksidaciji pri nevtralnem pH, pri čemer kot glavni produkti nastajajo dimeri EGCG, ki so pri nevtralnem pH podvrženi nadaljnji razgradnji. Glavna identificirana dimera sta teasinensin A in P2 (slika 11), med produkti avtooksidacije EGCG pa so identificirali tudi njuna epimera. Dimeri EGCG so rumeno-rjavo obarvani in absorbirajo svetlobo v območju valovnih dolžin od 350 do 400 nm (Hong in sod., 2002).



Slika 11: Kemijski strukturi dimerov EGCG teasinensina A in P2 (Bansal in sod., 2013).

Figure 11: Chemical structures of EGCG dimers theaflavins A and P2 (Bansal et al., 2013).

Na stabilnost katehinov vplivajo tudi prisotnost kisika in kovinskih ionov. Sang in sod. (2005) so EGCG inkubirali v fosfatnem pufru s pH 7,4, ki so ga prepiljali z dušikom. Po 6 h inkubacije se je ohranilo 95 % začetne vrednosti EGCG, medtem ko v fosfatnem pufru ob prisotnosti kisika EGCG niso več zaznali. Pokazali so tudi, da je oksidacija EGCG povezana s prisotnostjo kovinskih ionov, saj je dodatek etilendiamintetraoetne kisline (EDTA) znatno povečal stabilnost EGCG. Stabilnost katehinov je odvisna tudi od koncentracije katehinov v raztopini. V razredčenih raztopinah je oksidacija katehinov pospešena, saj takšne raztopine vsebujejo več raztopljenega kisika, omogočajo večjo molekularno mobilnost ter imajo višjo vrednost pH v primerjavi z bolj koncentriranimi raztopinami katehinov (Li in sod., 2012).

2.2.1.5 Kapsulacija katehinov

Uporaba katehinov v živilih je pogosto omejena z njihovo stabilnostjo pri razmerah, ki jih srečamo med procesiranjem in shranjevanjem živil. Poleg že omenjenih dejavnikov (temperatura, pH, prisotnost kisika in kovinskih ionov) na vsebnost in aktivnost katehinov v živilu vplivajo tudi njihove interakcije s proteini in drugimi sestavinami živila (Weerawatanakorn in sod., 2014). Številne raziskave vključujejo razvoj ustreznih kapsulacijskih postopkov in sistemov, ki bi omogočali podaljšan obstoj katehinov ter s tem razširili njihov spekter uporabe v živilske namene.

Zhang in sod. (2016) so kapsulirali (\pm)-katehin in komplekse (\pm)-katehina in cinka v nanodelce iz β -hitozana in natrijevega tripolifosfata (TPP). Delce so pripravili z metodo

ionotropnega geliranja ter pri tem testirali različna razmerja β -hitozana in (\pm)-katehina oziroma kompleksov (\pm)-katehina in cinka. Nastali delci iz β -hitozana so bili veliki 59,20 nm, medtem ko se je velikost delcev iz β -hitozana in (\pm)-katehina gibala od 116 do 627 nm, velikost delcev iz β -hitozana ter kompleksov (\pm)-katehina in cinka pa od 208 do 590 nm. Učinkovitost kapsulacije je v primeru (\pm)-katehina znašala 50-84 %, v primeru kompleksov (\pm)-katehina in cinka pa 53-89 %. Pokazali so, da je bila protibakterijska učinkovitost nanodelcev s kompleksi (\pm)-katehina in cinka proti bakterijskima vrstama *Escherichia coli* in *Listeria innocua* večja kot v primeru nanodelcev z nekompleksiranim (\pm)-katehinom, na splošno pa je bila protibakterijska učinkovitost manjših delcev večja v primerjavi s protibakterijsko učinkovitostjo večjih delcev.

Gómez-Mascaraque in sod. (2015) so kapsulirali EGCG v delce iz želatine, ki so jo predhodno raztopili v 20 % (v/v) očetni kislini in na ta način preprečili nezaželeno tvorbo gela. Delce so pripravili z metodo elektrorazprševanja; mešanico želatine in EGCG so razprševali pod vplivom zunanjega električnega polja, pri čemer je topilo odparelo iz kapljic, nastali delci pa so se zbrali na ozemljenem zbiralcu. Delci so bili submikrometrskih velikosti in so omogočali zelo visoko učinkovitost kapsulacije EGCG (96 (\pm 3) %). Sproščanje EGCG so testirali v treh različnih raztopinah: v etanolu, v fosfatnem pufru (pH 7,4) in v pufru MES (2-(N-morfolino)etansulfonska kislina; pH 6,1). V vseh primerih je prišlo do začetnega pospešenega sproščanja EGCG, ki je bilo v vodnih medijih bolj izrazito kot v etanolu. Z merjenjem antioksidativne aktivnosti prostega in kapsuliranega EGCG pri pH 7,4 so pokazali, da je kapsulacija povečala stabilnost EGCG v alkalnem mediju.

Shpigelman in sod. (2012) so pripravili nanodelce iz toplotno denaturiranega β -laktoglobulina in EGCG. Nastali nanodelci so bili veliki do 50 nm in so zaščitili EGCG pred oksidacijo. Vodna suspenzija nanodelcev je bila bistra in stabilna, kar je potrjevala tudi vrednost zeta potenciala nanodelcev (-40 mV). Učinkovitost kapsulacije EGCG je znašala 60-70 %, vsebnost EGCG glede na maso nanodelcev pa je znašala 12 %. S kapsulacijo so učinkovito zmanjšali grenak okus in trpkost EGCG. V simuliranem okolju prebavnega trakta je prišlo le do rahlega sproščanja EGCG, kar nakazuje, da bi takšni delci lahko omogočali zaščito EGCG pri prehodu skozi želodec ter tako povečali njegovo biodostopnost.

Rashidinejad in sod. (2014) so kapsulirali (\pm)-katehin in EGCG v liposome iz sojinega lecitina. Velikost praznih liposomov je znašala 133 nm, medtem ko je velikost liposomov s kapsuliranim (\pm)-katehinom in EGCG narasla na največ 170 nm oziroma 173 nm. Kapsulacija ni imela značilnega vpliva na zeta potencial liposomov, ki se je gibal od -42,4 do -46,1 mV, kar je kazalo na stabilnost liposomov v suspenziji. Tako v primeru (\pm)-katehina kot EGCG so dosegli več kot 70 % učinkovitost kapsulacije. Liposome s (\pm)-katehinom in EGCG so uporabili pri izdelavi trdega sira ter pokazali, da so se pri tem ohranili tako (\pm)-katehin in EGCG kot tudi struktura liposomov.

2.2.2 Granatno jabolko

Granatno jabolko (*Punica granatum* L.) je starodaven sadež, katerega uporabo so poznali že v Perziji in stari Grčiji. V naših krajih je granatno jabolko postalo prepoznavno šele v prejšnjem stoletju. Danes ga obsežno gojijo v Iranu, Indiji, mediteranskih deželah, v suhih predelih jugovzhodne Azije, v Maleziji in tropski Afriki, do določene mere pa tudi v Kaliforniji, Arizoni, na Kitajskem in Japonskem ter v Rusiji (Viuda-Martos in sod., 2010). Užitne dele granatnega jabolka lahko uživamo sveže, lahko jih uporabimo za pripravo soka in drugih pijač, želejev, sirupov in marmelad ali pa jih uporabimo kot aromo ali barvilo v drugih živilih (Mousavinejad in sod., 2009).

Sadež granatnega jabolka razdelimo na lupino, meso in semena. Lupina predstavlja približno 50 % teže celotnega sadeža in je bogata z bioaktivnimi snovmi, kot so flavonoidi, elagitanini in proantocianidini. Užitni del granatnega jabolka predstavljajo zrna ali arili, sestavljeni iz semena (10 %) in mesa, ki obdaja seme (40 %). Meso granatnega jabolka vsebuje 85 % vode, 10 % sladkorjev in 1,5 % pektina. Glavne bioaktivne spojine v mesu granatnega jabolka so antocianini, punikalagini, elagična kislina in tanini (Li in sod., 2006; Viuda-Martos in sod., 2010).

Granatno jabolko predstavlja bogat vir vitamina C ter prehranskih vlaknin. Sto gramov zrn granatnega jabolka ima energijsko vrednost 83 kcal in vsebuje 1,67 g proteinov, 18,7 g ogljikovih hidratov, 3 mg natrija, 236 mg kalija, 10 mg kalcija, 12 mg magnezija, 0,3 mg železa, 36 mg fosforja, 0,30 mg niacina in 10,2 mg vitamina C (USDA, 2015).

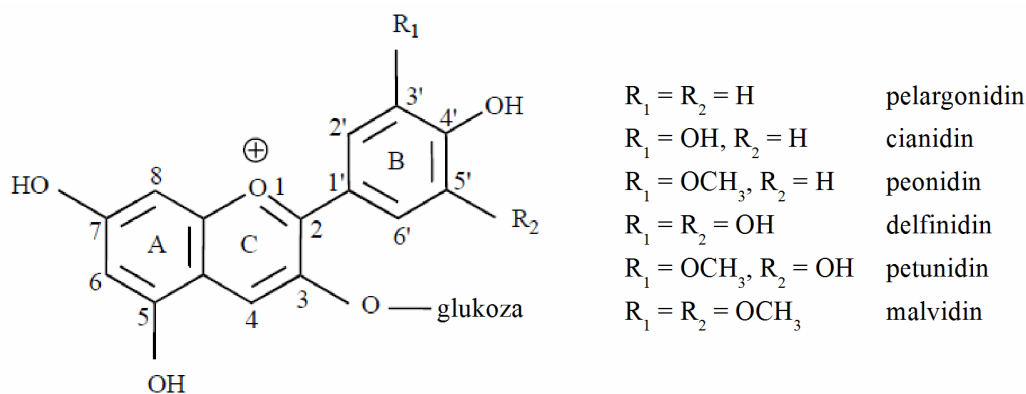
Poleg prehranske vrednosti granatnemu jabolku pripisujejo tudi številne zdravilne učinke, med drugimi snovi iz različnih delov granatnega jabolka delujejo protivirusno, protibakterijsko in antikancerogeno, delujejo zdravilno v primeru diabetesa in diareje, ščitijo ožilje in prebavni trakt, znižujejo vsebnost krvnih maščob, zavirajo rast parazitov ter izboljšujejo imunski sistem (Teixeira da Silva in sod., 2013). Raba granatnega jabolka je bila razširjena že v ljudski medicini kot zdravilo za grižo in različne krvavitve, za preprečevanje zobnih oblog in zatiranje parazitov ter za zdravljenje bolečega grla in hripavosti (Ismail in sod., 2012).

Za zdravilne učinke granatnega jabolka je odgovorno zlasti njegovo antioksidativno delovanje. Gil in sod. (2000) poročajo, da ima sok granatnega jabolka 3-krat večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi z rdečim vinom in zelenim čajem. Podobno so Seeram in sod. (2008) potrdili, da ima sok granatnega jabolka večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi s pijačami kot so jabolčni sok, sok iz jagod acai, češnjev sok, borovničev sok, robidov sok, grozdni sok, pomarančni sok, rdeče vino in ledeni čaj. Antioksidativno aktivnost granatnega jabolka je moč pripisati različnim fenolnim spojinam, kot so izomere

punikalagina, derivati elagične kisline in antocianini. Omenjene snovi dokazano lovijo proste radikale in preprečujejo lipidno oksidacijo *in vitro*. Nekateri avtorji poročajo, da k celokupni antioksidativni aktivnosti granatnega jabolka sicer največ doprinese punikalagin, ki se nahaja v lupini granatnega jabolka, medtem ko imajo antocianini iz aril pri tem le manjšo vlogo. Mehanizem antioksidativnega delovanja spojin granatnega jabolka še ni pojasnjen, saj je antioksidativno delovanje snovi v bioloških matrikah kompleksnejše in odvisno od številnih dejavnikov (Viuda-Martos in sod., 2010).

2.2.2.1 Antocianini

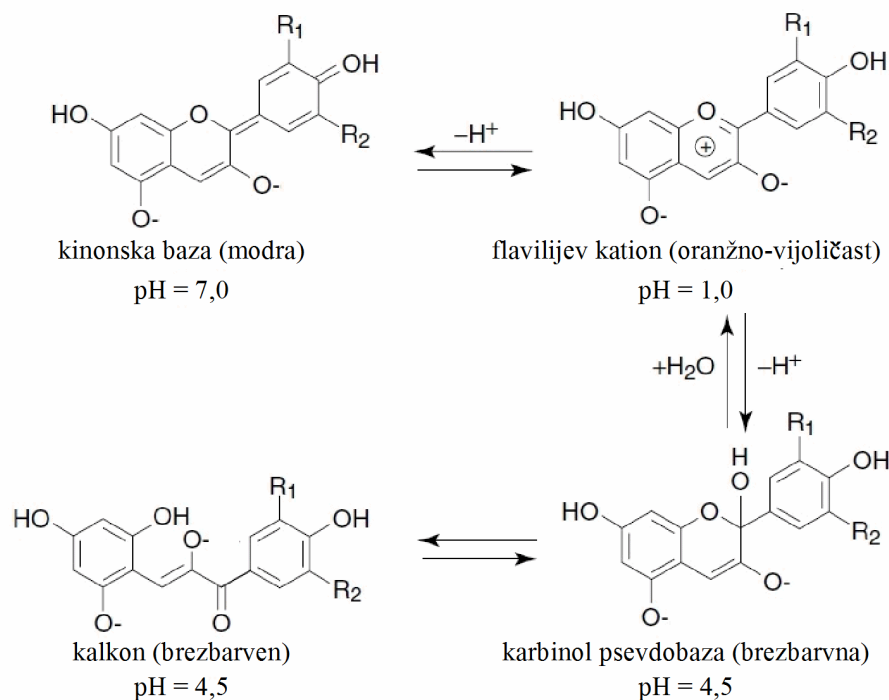
Največja in najpomembnejša skupina floavonoidov v arilih granatnega jabolka so antocianini, ki so odgovorni za značilno rdečo barvo sadeža. Najpogostejši antocianini so: pelargonidin, cianidin, peonidin, delfinidin, petunidin in malvidin (slika 12). Strukture antocianinov variirajo glede na monosaharid, vezan na pozicijah 3 in 5, na katerega so lahko vezani tudi ostanki organskih kislin (Lee in sod., 2005). V granatnem jabolku so najbolj zastopani antocianini cianidin-3-O-glukozid, cianidin-3,5-di-O-glukozid, delfinidin-3-O-glukozid, delfinidin-3,5-di-O-glukozid, pelargonidin-3-O-glukozid in pelargonidin-3,5-di-O-glukozid (Jaiswal in sod., 2010).



Slika 12: Osnovna struktura antocianinov (Lee in sod., 2005).

Figure 12: Basic anthocyanin structure (Lee et al., 2005).

Za antocianine je značilno, da so s spremembo pH podvrženi reverzibilnim strukturnim transformacijam, ki se kažejo z izrazito spremembo absorpcijskih spektrov. Pri pH 7,0 prevladujejo antocianini s strukturo kinonske baze, ki je obarvana modro. Pri pH 1,0 so antocianini v obliki flavilijevega kationa, ki daje barvo v odtenkih od oranžne do vijoličaste. Pri pH 4,5 prevladuje karbinol psevdobaza, ki je brezbarvna in lahko prehaja v prav tako brezbarvno strukturo kalkona (slika 13) (Giusti in Wrolstad, 2001).



Slika 13: Prevladujoče strukturne oblike antocianinov pri posameznih vrednostih pH (Giusti in Wrolstad, 2001).
Figure 13: Predominant structural forms of anthocyanins present at different pH levels (Giusti and Wrolstad, 2001).

2.2.2.2 Stabilnost antocianinov granatnega jabolka

Stabilnost polifenolnih spojin v soku granatnega jabolka je odvisna od vrednosti pH, koncentracije kisika, svetlobe, temperature ter prisotnosti snovi, kot so askorbinska kislina, kovinski ioni in različni encimi (Shipp in Abdel-Aal, 2010). Antocianini v soku granatnega jabolka so relativno stabilni pri kratkotrajnih izpostavitvah visokim temperaturam, npr. med postopkom pasterizacije, medtem ko v primeru dolgotrajnejšega shranjevanja pri povišani temperaturi prihaja do nastanka rjavo obarvanih produktov. Nastanek rjavo obarvanih produktov je med drugimi lahko posledica delovanja encima polifenol oksidaze, ki katalizira pretvorbo fenolnih spojin v kinone. Polifenol oksidazo najdemo v živalih, rastlinah, glivah in bakterijah. Kinoni so zelo reaktivni in hitro polimerizirajo v temno obarvane melanine (Rapenau in sod., 2006). Stabilnost antocianinov je odvisna tudi od prisotnosti kisika. Jaiswal in sod. (2010) so pokazali, da je bil cianidin-3-glukozid ob izpostavitvi povišani temperaturi v dušikovi atmosferi stabilen, medtem ko se je v prisotnosti kisika razgradilo 65 % cianidin-3-glukozida.

2.2.2.3 Uporaba izvlečkov granatnega jabolka v živilstvu

Živila so podvržena oksidaciji, ki poslabša njihovo kakovost in povzroči kvar. Pri oksidaciji živil se oksidirajo vitamini in esencialne maščobne kisline, kar privede do zmanjšane hranilne vrednosti živila ter do spremembe senzoričnih lastnosti, saj se spremeni barva, tekstura in okus živila (Viuda-Martos in sod., 2010). Sestavine granatnega jabolka se v živilstvu lahko uporabljajo kot naravni antioksidanti in tako nadomestijo sintetične antioksidante. Primer uporabe granatnega jabolka kot vira antioksidantov opisujejo Mastrodi Salgado in sod. (2012), ki so pomarančni sok z jagodami in paradižnikov sok obogatili z dodatkom 2,0 % izvlečka lupine granatnega jabolka. Pomarančni sok z jagodami in dodanim izvlečkom je imel več kot 30-krat večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi s kontrolo, medtem ko je imel paradižnikov sok z izvlečkom 25-krat večjo antioksidativno aktivnost kot sok brez dodanega izvlečka.

Ahmed in sod. (2015) so stranske produkte pri izdelavi soka granatnega jabolka uporabili pri krmi za piščance ter na ta način izboljšali kakovost mesa. Piščančje meso je vsebovalo povečano koncentracijo proteinov in mineralov, medtem ko se je vsebnost holesterola in nasičenih maščobnih kislin znižala. Poleg tega je uporaba stranskih produktov granatnega jabolka zmanjšala lipidno oksidacijo in mikrobiološko kvarjenje piščančjega mesa.

Mahajan in sod. (2015) so izvlečke lupine granatnega jabolka uporabili kot naravni konzervansi v siru. V siru z izvlečki granatnega jabolka so pokazali manjšo vsebnost produktov oksidacije v primerjavi s kontrolo, dokazali pa so tudi protimikrobne učinke izvlečka. Posledično je bila senzorična ocena sira z izvlečkom boljša v primerjavi s sirom brez izvlečka.

Poleg hranilne vrednosti živil ima pomembno vlogo tudi sam izgled živila. Potrošniki pogosto povezujejo barvo živila z njegovim vonjem in okusom, vendar med procesiranjem in shranjevanjem prihaja do spremembe barve živil. Živilska industrija tako že vrsto let uporablja različna barvila, da bi na ta način zagotovila ohranitev pričakovanega izgleda živilskih izdelkov. Številne raziskave so usmerjene v preučevanje antocijaninov kot naravnih barvil. Antocijanini se večinoma uporabljajo za obarvanje živil z nizko vrednostjo pH, ki omogoča ohranjanje stabilne oblike antocijaninov in s tem barve živila (Shipp in Abdel-Aal, 2010). Primer izdelka, obogatenga z antocijanini, predstavlja grški jogurt z dodanim koncentriranim sokom granatnega jabolka, ki je razširjen zlasti v Združenem kraljestvu in ZDA (Trigueros in sod., 2014).

2.2.2.4 Kapsulacija izvlečkov granatnega jabolka

V literaturi so opisani številni primeri kapsulacije spojin iz lupine in semen granatnega jabolka (Cam in sod., 2014; Goula in Adamopoulos, 2012; Kalamara in sod., 2014; Zam in sod., 2014), medtem ko je kapsulaciji snovi iz soka granatnega jabolka posvečenih manj raziskav. Primer stabilizacije in olajšanega rokovanja z antocianini iz soka granatnega jabolka opisujejo Vardin in Yasar (2012), ki so optimizirali postopek kapsulacije soka granatnega jabolka v nosilce iz maltodekstrina z metodo sušenja z razprševanjem. Z dodatkom maltodekstrina so dosegli visok izkoristek kapsulacije ter značilno zmanjšali higroskopičnost in lepljivost končnih vzorcev. Največje razmerje med sokom in maltodekstrinom, ki je še omogočalo izdelavo delcev, je bilo 1:1. Pokazali so, da je povišanje temperature vstopnega zraka v sušilno komoro povzročilo znižano topnost končnega produkta, izgubo antocianinov ter zmanjšalo gostoto končnega produkta in vsebnost vode.

Robert in sod. (2010) opisujejo kapsulacijo soka in etanolnega izvlečka soka granatnega jabolka v nosilce iz maltodekstrina in sojinih proteinov z metodo sušenja z razprševanjem. Po optimizaciji procesa kapsulacije so dosegli učinkovitost kapsulacije celokupnih polifenolnih spojin v razponu od 36,6 % do 82,8 % ter učinkovitost kapsulacije antocianinov v razponu od 35,8 % do 100 %. Kapsulacija celokupnih polifenolnih spojin je bila boljša v primeru uporabe sojinih proteinov, medtem ko je uporaba maltodekstrina omogočala boljšo učinkovitost kapsulacije antocianinov. Stabilnost kapsuliranih kompleksov so testirali z inkubacijo pri temperaturi 60 °C ter pokazali, da so mikrokapsule iz maltodekstrina omogočile značilno boljšo zaščito polifenolnih spojin in antocianinov v primerjavi z mikrokapsulami iz sojinih proteinov. Ob dodatku mikrokapsul v jogurt se stabilnost kapsuliranih komponent v večini primerov ni razlikovala od stabilnosti prostih komponent.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE

Ime kemikalije	Proizvajalec, država porekla
(-)-epigalokatehin-3-galat (>90 %; TEAVIGO)	Hermes Consilium, Slovenija
2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina (HEPES)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Aceton	Merck, Nemčija
Acetonitril	Merck, Nemčija
Alginat (A2111)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Alginat (A2158)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Cianidin-3-arabinozid	Extrasynthese, Francija
Cianidin-3-glukozid	Extrasynthese, Francija
Cianidin-3,5-diglukozid	Extrasynthese, Francija
Citronska kislina, monohidrat	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Delfinidin-3-glukozid	Extrasynthese, Francija
Delfinidin-3,5-diglukozid	Extrasynthese, Francija
Etanol	Merck, Nemčija
Fosfatni pufer (Dulbecco 'A' Tablets)	Oxoid, Združeno kraljestvo
Heksan	Merck, Nemčija
Hitozan	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Kalijev klorid (KCl)	Merck, Nemčija
(±)-katehin	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Kloroform	Merck, Nemčija
Klorogenska kislina	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Klorovodikova kislina (37 %) (HCl)	Merck, Nemčija
Metanol	Merck, Nemčija
Mravljična kislina (HCOOH)	Merck, Nemčija
Natrijev acetat (CH_3COONa)	Merck, Nemčija
Natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, Nemčija
Natrijev karbonat (Na_2CO_3)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Natrijev tripolifosfat	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Ocetna kislina (CH_3COOH)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Pektin, 26-30 % esterificiran	Wild, Nemčija
Pelargonidin-3-glukozid	Extrasynthese, Francija
Pelargonidin-3,5-diglukozid	Extrasynthese, Francija

Phospholipon 90 G	Lipoid, Nemčija
Poliglicerol poliricinoleat (PGPR 4150)	Palsgaard, Danska
Pululan	TCI Europe, Belgija
Rafinerirano sončnično olje	Zvijezda, Hrvaška
Reagent Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Saharoza	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
Sudan II	Wild, Nemčija

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

Oprema

Centrifuga Centric 322B
Centrifuga Rotanta 460 R
Digitalna kamera ICC50 HD
Digitalni denzitometer PAAR 60
Digitalni tensiometer K10ST
Filtri (0,45 µm; 0,22 µm)
HPLC 1260 Infinity
Kalorimeter DSC 1
Kapilarni viskozimeter po Ubbelodheju
Kapsulator Encapsulator B-395 pro
Kolorimeter CR-10 Chroma
Laboratorijska štoparica
Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD
Magnetno mešalo
Radiometer CDM230 Conductivity Meter
Rotor-stator homogenizator Micra D-9
Spektrometer FTIR Spectrum BX
Svetlobni mikroskop DM750
Tehtnica AT201
Tehtnica Exacta 2200 EB
Temperaturni senzor Conductivity Cell
CDC866T
Termostatska kopel CT52
Ultrasonikator VCX (750 W)
Ultrazvočna kopel
UV-VIS spektrofotometer HP 8453
Vrstični elektronski mikroskop Supra 35 VP
Zetasizer Nano ZS

Proizvajalec, država porekla

Tehtnica Železniki, Slovenija
Hettich Zentrifugen, Nemčija
Leica Microsystems, Nemčija
Anton Paar, K.G., Nemčija
Krüss, Nemčija
Millipore, ZDA
Agilent Technologies, ZDA
Mettler Toledo, Švica
SCHOTT Instruments, Nemčija
Büchi, Švica
Minolta, Japonska
Hanhart, ZDA
Martin Christ, Nemčija
IKA, Nemčija
Radiometer Analytical SAS, Francija
Micra, Nemčija
Perkin-Elmer, ZDA
Leica Microsystems, Nemčija
Mettler Toledo, Švica
Tehtnica Železniki, Slovenija
Radiometer Analytical SAS, Francija
SCHOTT Instruments, Nemčija
Sonics, ZDA
Kambič, Slovenija
Hawlett-Packard, ZDA
Carl Zeiss, Nemčija
Malvern Instruments, ZK

3.3 METODE

3.3.1 Karakterizacija polisaharidov kot nosilnih materialov za kapsulacijo

Kot ogrodne materiale za kapsulacijo katehinov in izvlečkov granatnega jabolka smo izbrali polisaharide; osredotočili smo se na alginat in pektin kot anionska polielektrolita, hitozan kot kationski polielektrolit ter pululan kot nevtralni polisaharid. V prvem delu doktorske naloge smo različne koncentracije (0,5 %; 1,0 %; 1,5 % in 2,0 % (m/m)) raztopin polisaharidov okarakterizirali glede na gostoto, električno prevodnost, viskoznost in površinsko napetost.

3.3.1.1 Gostota

Gostoto vodnih raztopin polisaharidov smo merili z digitalnim denzitometrom PAAR 60 (Anton Paar, K.G. Gradec, Avstrija) s termostatiranim nihajnim sistemom DMA 601, v kombinaciji z digitalnim termometrom DT 100-20 (Paar). Merjenje gostote z oscilacijskim denzitometrom temelji na naslednji osnovi: če votla celica (oscilator), ki vsebuje tekočino ali plin, vibrira, je njena lastna frekvenca odvisna od mase in s tem tudi od gostote tekočine ali plina (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Oscilator, napolnjen z vzorcem, niha s frekvenco med 200 in 400 Hz. Instrument pri tem meri čas, ki je potreben za določeno število nihajev.

Gostoto vodnih raztopin polisaharidov smo merili pri temperaturi 25 °C. Raztopine polisaharidov smo pred merjenjem filtrirali skozi membranski filter z 0,45 µm porami (Millipore, ZDA). Oscilacijsko kapilaro smo napolnili z injekcijsko brizgo ter raztopino v kapilari termostatirali 10 min. Za vsako raztopino smo naredili 15 meritev nihajnega časa. Ob menjavi raztopin smo oscilacijsko kapilaro denzitometra trikrat sprali z destilirano vodo in acetonom. Kapilaro smo osušili s prepihanjem z zrakom.

Gostoto smo izračunali na podlagi gostote vode d_{voda} , konstante denzitometra A in nihajne periode vode τ_{voda} , kot je opisano v Rudan-Tasič in Klofutar (2007):

$$d = d_{voda} + \frac{1}{A}(\tau^2 - \tau_{voda}^2) \quad \dots (1)$$

Napako izmerjene gostote raztopine polisaharidov δd smo dobili z odvajanjem enačbe 1, pri čemer smo upoštevali, da je napaka gostote vode (δd_{voda}) zanemarljiva:

$$(\delta d)^2 = \left(\frac{2\tau}{A}\right)^2 \delta\tau^2 + \left(-\frac{2\tau_{voda}}{A}\right)^2 \delta\tau_{voda}^2 + \left[\left(-\frac{\tau^2}{A^2}\right)^2 + \left(\frac{\tau_{voda}^2}{A^2}\right)^2\right] \delta A^2 \quad \dots (2)$$

3.3.1.2 Električna prevodnost

Električno prevodnost raztopin polisaharidov smo izrazili v obliki specifične električne prevodnosti χ , ki odraža naravo raztopine in je odvisna od površine elektrod in razdalje med elektrodama (enačba 3). Enota za specifično prevodnost je $1/(\Omega\text{m})$ ali S/m (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

$$\chi = \frac{l}{aR} \quad \dots (3)$$

kjer je l razdalja med elektrodama in a površina elektrod. Parametra l in a sta pri določenem elektrodnem paru konstantna; njuno razmerje imenujemo konstanta celice K (cm^{-1}):

$$K = \frac{l}{a} \quad \dots (4)$$

Iz geometrije celice konstanto celice lahko le ocenimo, zato celice za merjenje prevodnosti umerjamo s standardnimi raztopinami KCl. Postopek umerjanja poteka tako, da izmerimo prevodnost raztopine KCl z znano specifično prevodnostjo in na podlagi enačbe 4 izračunamo konstanto celice (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Specifično prevodnost raztopin polisaharidov smo merili z instrumentom Radiometer CDM230 Conductivity Meter (Radiometer Analytical SAS, Francija) in s štiri-polno platinizirano celico z vgrajenim temperaturnim senzorjem Conductivity Cell CDC866T (Radiometer Analytical SAS, Francija). Pred merjenjem smo celico potopili v deionizirano vodo za 1-2 h.

Celico smo umerili z raztopino KCl s koncentracijo 0,01 D (0,74526 g KCl na 1 kg raztopine). Celico smo potopili v erlenmajerico z raztopino KCl, ki smo jo 15 min termostatirali v vodni kopeli pri 25,0 °C. Vrednost konstante celice smo nastavili tako, da je specifična prevodnost standardne raztopine KCl znašala 1,409 mS/cm.

Za merjenje specifične električne prevodnosti raztopin polisaharidov smo sveže pripravljene raztopine filtrirali skozi membranski filter z 0,45 μm porami (Millipore, ZDA). Celico za merjenje prevodnosti smo potopili v čašo z raztopino polisaharida ter termostatirali 15 min pri 25,0 °C. Specifična električna prevodnost je predstavljala povprečje 10 meritev. Pri menjavi vzorcev smo elektrodo sprali z bidestilirano vodo in acetonom ter posušili.

3.3.1.3 Viskoznost

Viskoznost je merilo za upor tekočin do pretoka. Upor nastane zaradi notranjih sil trenja med premikanjem plasti tekočine, do katerega pride, kadar delujemo na tekočino s silo (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Viskoznost smo merili s kapilarnimi viskozimetri po Ubbelodheju (SCHOTT Instruments, Nemčija). Metoda temelji na merjenju časa, ki je potreben, da določen volumen raztopine prepotuje skozi kapilaro z določenim premerom in dolžino. Glede na pretočne čase raztopin, ki naj bi znašali od 200 s do 1000 s, smo izbrali naslednje viskozimetre: 501 01, 501 11 in 530 23. V viskozimeter smo z injekcijsko brizgo nanесли približno 15 ml vzorca ter viskozimeter vstavili v termostatsko kopel CT52 (SCHOTT Instruments, Nemčija), segreto na 25,0 °C. Pred vsakim merjenjem smo vzorec termostatirali 20 min. Za dvig tekočine v kapilari smo uporabili ročno zračno črpalko. Pretočne čase raztopin smo merili z laboratorijsko štoparico s točnostjo $\pm 0,01$ s (Hanhart, ZDA). Za vsak vzorec smo naredili 5 meritev pretočnih časov. Med menjavo vzorcev smo viskozimetre očistili z žvepleno kislino in bidestilirano vodo.

Kinematična viskoznost ν je definirana kot razmerje dinamične viskoznosti in gostote tekočine:

$$\frac{\eta}{\rho} = \nu = kt \quad \dots (5)$$

kjer je η dinamična viskoznost, ρ gostota tekočina, t pretočni čas in k konstanta kapilarnega viskozimetra. Konstanto k običajno določimo z merjenjem pretočnih časov tekočin z znanimi viskoznostmi. V primeru viskozimetra 501 01 smo merili pretočne čase bidestilirane vode ($\nu = 0,00890$ cm²/s; Kestin in sod., 1978), v primeru viskozimetrov 501 11 in 530 23 pa smo merili pretočne čase 50 % (m/m) raztopine saharoze ($\nu = 0,1014$ cm²/s; Mathlouthi in Génotelle, 1995) in 65 % (m/m) raztopine saharoze ($\nu = 0,80215$ cm²/s; Mathlouthi in Génotelle, 1995). Na podlagi znanih viskoznosti standardnih tekočin ter izmerjenih pretočnih časov standardnih tekočin in raztopin polisaharidov smo izračunali kinematične viskoznosti raztopin polisaharidov z uporabo naslednje zveze:

$$\frac{\nu_0}{\nu_1} = \frac{t_0}{t_1} \quad \dots (6)$$

Kjer sta ν_0 in t_0 kinematična viskoznost in pretočni čas vode oziroma standardne raztopine saharoze ter ν_1 in t_1 kinematična viskoznost in pretočni čas raztopine polisaharida. Enota za kinematično viskoznost je m²/s.

Rezultate smo izrazili v obliki dinamične viskoznosti η (enačba 5). Enota za dinamično viskoznost je poise (P) (g/(cm s)) oziroma Pa s (1 Pa s = 10 P). Natančnost viskozimetra smo spremljali s pogostim merjenjem pretočnih časov standardnih raztopin pri 25,0 °C, ki se med seboj niso smeli razlikovati za več kot 0,30 s.

3.3.1.4 Površinska napetost

V primeru, da želimo povečati površino tekočine, moramo iz njene notranjosti dovesti nove molekule. Delo dw , ki ga pri tem opravimo, je sorazmerno s povečanjem površine (dS):

$$dw = \gamma dS \quad \dots (7)$$

Pri tem je površinska napetost definirana kot sorazmernostni faktor γ (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Površinsko napetost smo določevali z digitalnim tenziometrom K10ST (Krüss, Nemčija), pri čemer smo uporabili Wilhelmijevo metodo s ploščico. Metoda temelji na merjenju sile pri vleku platinaste ploščice z znanimi dimenzijami iz tekočine. Površinsko napetost lahko opišemo z naslednjim izrazom:

$$\sigma = \frac{F}{L \cos \theta} \quad \dots (8)$$

Kjer je σ površinska napetost tekočine, L dolžina ploščice, F sila, ki deluje na ploščico ob stiku s tekočino in θ kontaktni kot ploščice s tekočino. Ploščica je pritrjena na senzor tenziometra, ki meri silo F , in je običajno iz platine, ki omogoča, da je stik ploščice s tekočino pod kotom $\theta = 0^\circ$ ($\cos \theta = 1$). Za vsako raztopino polisaharida smo naredili 5 meritev površinske napetosti pri temperaturi 25,0 °C. Instrument je podal direktne vrednosti površinske napetosti v enotah mN/m (Krüss, 2015).

3.3.2 Mikrokapsulacija (\pm)-katehina in EGCG

V drugem delu raziskovalnega dela smo se ukvarjali s kapsulacijo (\pm)-katehina in EGCG v tri različne kapsulacijske sisteme: liposome, mikrodelce iz alginata ali hitozana ter mikrodelce iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi. Kapsulacijske sisteme smo okarakterizirali glede na učinkovitost kapsulacije, sproščanje jedrnih spojin in morfologijo delcev. Spremljali smo stabilnost prostih in kapsuliranih spojin v raztopinah z različnimi vrednostmi pH ter v sadnem nektarju. Interakcije med EGCG in kapsulacijskimi sistemi smo podrobneje preučili z meritvami diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) in infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo (FTIR).

3.3.2.1 Kapsulacija (\pm)-katehina in EGCG v liposome

(\pm)-katehin in EGCG smo kapsulirali v liposome, ki smo jih pripravili z metodo proliposomov (Perret in sod., 1991). Za pripravo praznih liposomov smo 1 g sojinega lecitina Phospholipon 90 G raztopili v 1 ml etanola ter nato ob mešanju na magnetnem mešalu dodali 2 ml 0,1 % (m/m) raztopine citronske kisline (pH 3,4); pri tem je nastala kremasta zmes oziroma mešanica proliposomov. Zmes smo med konstantnim mešanjem 5 minut segrevali v vodni kopeli na 60 °C ter nato ohladili na 25 °C. Nadaljevali smo z mešanjem ter po kapljicah dodajali 0,1 % (m/m) raztopino citronske kisline do končnega skupnega volumna 50 ml. Ob stiku z vodno raztopino so se iz zmesi proliposomov postopno oblikovali liposomi. Za kapsulacijo (\pm)-katehina in EGCG smo zatehtali 100 mg posamezne snovi ter jo dodali k lecitinu pred dodatkom etanola, ostali koraki so bili enaki kot v primeru priprave praznih liposomov.

3.3.2.2 Kapsulacija (\pm)-katehina in EGCG v mikrodelce iz hitozana ali alginata

Pripravili smo 1,5 % (m/m) in 2,0 % (m/m) raztopino alginata v destilirani vodi ter 1,5 % (m/m) in 2,0 % (m/m) raztopino hitozana v 1,0 % (v/v) očetni kislini. V raztopine smo dodali (\pm)-katehin in EGCG do končne koncentracije 0,67 mg/ml. Mikrodelce smo pripravili s kapsulatorjem Encapsulator B-395 pro, Büchi (Flawil, Švica) ter pri tem uporabili naslednje pogoje:

- premer šobe: 150 μ m
- frekvenca: 1200 Hz
- napetost: 800 V
- pretok: 2,5 ml/min

Kot utrjevalno raztopino smo uporabili 1,5 % (m/v) in 2,0 % (m/v) raztopino CaCl₂ v primeru alginatnih mikrodelcev ter 1,5 % (m/v) in 2,0 % (m/v) raztopino TPP v primeru mikrodelcev iz hitozana. Po končani kapsulaciji smo nemudoma vzorčili utrjevalno raztopino za določanje učinkovitosti kapsulacije in nato mikrodelce ločili iz utrjevalne raztopine s pomočjo vakuumske filtracije.

3.3.2.3 Kapsulacija liposomov s (\pm)-katehinom in EGCG v mikrodelce iz alginata ali hitozana

Za pripravo mikrodelcev z liposomi smo suspenzije liposomov (prazni liposomi, liposomi s (\pm)-katehinom in liposomi z EGCG) zmešali z 1,5 % (m/m) raztopino alginata oziroma

hitozana v razmerju 1:2. Mikrodelce smo pripravili s kapsulatorjem Encapsulator B-395 pro, Büchi (Flawil, Švica) pod naslednjimi pogoji:

- premer šobe: 150 μm
- frekvenca: 1000 Hz
- napetost: 900 V
- pretok: 2,5 ml/min

Kot utrjevalno raztopino smo uporabili 1,0 % (m/v) CaCl_2 za alginatne mikrodelce ter 1,0 % (m/v) TPP za mikrodelcev iz hitozana. Po končani kapsulaciji smo delce do nadaljnjih analiz shranili v utrjevalni raztopini. Za SEM, FTIR in DSC smo mikrodelce ločili iz utrjevalne raztopine, sprali z destilirano vodo in liofilizirali (Christ Alpha 1-2 LD, Nemčija) 48 h pri $-50\text{ }^\circ\text{C}$ in 0,056 mbar.

3.3.2.4 Učinkovitost kapsulacijskih sistemov pri zaščiti (\pm)-katehina in EGCG v raztopinah z različnimi vrednostmi pH in v sadnem nektarju

Za ugotavljanje učinkovitosti različnih kapsulacijskih sistemov pri zaščiti (\pm)-katehina in EGCG smo določali učinkovitost kapsulacije, merili časovno sproščanje jedrnih spojin iz kapsulacijskih sistemov ter določali vsebnost celokupnih jedrnih spojin s časom inkubacije v raztopinah z različnimi vrednostmi pH. Kapsulacijske sisteme smo testirali tudi v izbranem živilu – sadnem nektarju, kjer smo spremljali celokupno koncentracijo jedrnih spojin v odvisnosti od časa.

Za določevanje koncentracij (\pm)-katehina in EGCG smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC; 1260 Infinity; Agilent Technologies, ZDA) s kolono Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, ZDA; 4,6 mm \times 150 mm; 3,5 μm). Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline (A) in 0,1 % mravljične kisline v acetonitrilu (B). Izpiranje je potekalo po linearnem gradientu, kot je opisano v preglednici 5. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 1,0 ml/min, detekcija pa v ultravijoličnem območju pri valovni dolžini 280 nm. Za izračun koncentracij (\pm)-katehina in EGCG smo na podlagi površin vrhov poznanih koncentracij standardov pripravili umeritveni krivulji v koncentracijskem območju od 5 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$ za (\pm)-katehin ($R^2=1$) in EGCG ($R^2=1$).

Preglednica 5: Časi izpiranja in deleži mobilne faze A pri metodi določanja (\pm)-katehina in EGCG s HPLC.

Table 5: Elution times and composition of mobile phase A for determination of (\pm)-catechin and EGCG with HPLC.

Čas izpiranja (min)	A (%)
0-2	92
2-15	92-65
15-16	65
16-17	65-92
17-19	92

Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG v različne kapsulacijske sisteme smo določali posredno z merjenjem koncentracije nekapsuliranega (\pm)-katehina in EGCG. Pri kapsulaciji v liposome smo liposome ločili iz suspenzije s centrifugiranjem 3 h pri 10000 g in 4 °C ter koncentracijo nekapsuliranih komponent v supernatantu določili s HPLC. V primeru kapsulacije v mikrodelce iz alginata ali hitozana z in brez vključenih liposomov smo vzorčili utrjevalno raztopino ter s HPLC določili koncentracijo nekapsuliranih komponent. Učinkovitost kapsulacije (UK) in vsebnost komponente (VK) smo izračunali po enačbah 9 in 10:

$$UK (\%) = \frac{(\text{masa celokupne komponente} - \text{masa nekapsulirane komponente})}{\text{masa celokupne komponente}} \times 100 \quad \dots (9)$$

$$VK (\%) = \frac{(\text{masa celokupne komponente} - \text{masa nekapsulirane komponente})}{\text{masa liposomov oz. mikrodelcev}} \times 100 \quad \dots (10)$$

V nadaljevanju smo preučevali sproščanje (\pm)-katehina in EGCG iz posameznih kapsulacijskih sistemov. Za preučevanje sproščanja iz mikrodelcev iz alginata ali hitozana brez vključenih liposomov smo mikrodelce ločili iz utrjevalne raztopine z vakuumsko filtracijo. Mikrodelce, zbrane na filtrirnem papirju, smo prenesli v svežo destilirano vodo. Suspenzije mikrodelcev smo inkubirali 1 h pri 25 °C med rahlim mešanjem. Ob vnaprej določenih časovnih točkah smo vzorčili po 1 ml vodne raztopine ter s HPLC določili koncentracijo sproščenega (\pm)-katehina oziroma EGCG.

V primeru kapsulacije v liposome in v mikrodelce z vključenimi liposomi smo pričakovali upočasnjeno sproščanje (\pm)-katehina in EGCG. Sproščanje smo spremljali v časovnem obdobju 14 dni pri različnih vrednostih pH (pH 2,0; 4,0 in 6,0). Enake volumne suspenzij liposomov oziroma mikrodelcev z vključenimi liposomi smo prenesli v 15-ml centrifugirke. Po sedimentaciji mikrodelcev oziroma centrifugiranju suspenzije liposomov (10000 g, 3 h, 4 °C) smo supernatante odstranili ter dodali ustrezno raztopino do končne koncentracije (\pm)-katehina oziroma EGCG 100 $\mu\text{g/ml}$. Za pH 2,0 in pH 4,0 smo uporabili 0,2 % (m/v) (pH = 2,04) in 0,01 % (m/v) (pH = 4,03) raztopino citronske kisline, za pH 6,0 pa 10 mM Hepes, kateremu smo pH naravnali z 10 M NaOH.

Tako pripravljene suspenzije smo inkubirali pri 25 °C v temi. Ob vnaprej določenih časovnih točkah smo v posameznih vzorcih določili koncentracijo sproščenih komponent ter koncentracijo celokupnih komponent. Za določanje koncentracije sproščenih komponent smo vzorce centrifugirali (3 h pri 10000 g in 4 °C v primeru liposomov ter 5 min pri 4000 obr/min v primeru mikrodelcev) ter s HPLC določili koncentracijo (±)-katehina in EGCG v supernatantu.

Za določanje celokupne koncentracije (±)-katehina in EGCG v suspenzijah smo mikrodelce razbili z uporabo 750 W ultrasonikatorja (Sonics and Materials, ZDA). Sonicirali smo 2 min pri 40 % amplitudi, na ledu, v ciklih 10 s soniciranja in 10 s premora. Iz suspenzij razbitih mikrodelcev in iz suspenzij liposomov smo odstranili lipide s pomočjo metode, ki jo opisujeta Bligh in Dyer (1959). Pri tem smo 900 µl suspenzije razbitih mikrodelcev oziroma 900 µl suspenzije liposomov (razredčene z vodo v razmerju 1:8) zmešali s 1000 µl metanola in 1000 µl kloroforma. Mešanice smo dobro premešali ter počakali, da je prišlo do ločitve faz. Koncentraciji celokupnega (±)-katehina in EGCG smo določili v fazi metanol:voda s HPLC.

Delež sproščenega (±)-katehina in EGCG smo izračunali po enačbi 11:

$$\text{Sproščanje (\%)} = \frac{\text{masa sproščene komponente}}{\text{masa celokupne komponente v suspenziji liposomov/mikrodelcev}} \times 100 \quad \dots (11)$$

Učinkovitost kapsulacijskih sistemov pri zaščiti (±)-katehina in EGCG pri različnih vrednostih pH smo ugotavljali tako, da smo koncentracije celokupnega (±)-katehina in EGCG v suspenzijah liposomov in mikrodelcev z liposomi primerjali s koncentracijami prostega (±)-katehina in EGCG v enakih časovnih točkah.

Za testiranje učinkovitosti kapsulacijskih sistemov pri zaščiti (±)-katehina in EGCG v realnem sistemu smo spremljali stabilnost prostih komponent ter komponent, kapsuliranih v liposome oziroma v mikrodelce z liposomi, v sadnem nektarju (Fruc pomaranča in limona, Fructal, Slovenija). Prosto in kapsulirano komponento smo dodali v sok do končne koncentracije 100 µg/ml. Ob izbranih časovnih točkah smo v primeru prostega (±)-katehina in EGCG nektar centrifugirali 15 min pri 15 obr/min. Supernatant smo 10 x redčili ter določili koncentracijo (±)-katehina in EGCG s HPLC. V primeru kapsuliranih komponent smo jih sprva izolirali iz liposomov in mikrodelcev z liposomi ter nato s HPLC določili koncentracijo (±)-katehina in EGCG.

3.3.2.5 Določanje velikosti liposomov, zeta potenciala in polidisperznega indeksa

Velikost liposomov, zeta potencial in polidisperzni indeks smo merili z napravo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Združeno kraljestvo). Rezultati predstavljajo povprečje treh

meritev. Pred merjenjem smo vzorce razredčili v mediju, v katerem smo pripravili liposome (0,1 % (m/m) raztopina citronske kisline; pH = 3,4), v razmerju 1:100. Merjenja smo izvedli 24 h po pripravi liposomov.

3.3.2.6 Morfologija mikrodelcev

Morfologijo mikrodelcev v vodni suspenziji smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom DM750 (Leica Microsystems, Nemčija) opremljenim z digitalno kamero ICC50 HD (Leica Microsystems, Nemčija).

Morfologijo liofiliziranih delcev pred in po ekstrakciji kapsuliranih komponent smo opazovali z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM; SEM SUPRA 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija). SEM omogoča opazovanje površin preparatov z ločljivostjo v rangu enega nanometra v širokem razponu povečav (od 50- do 100 000-krat). Izvor nastanka signala predstavlja snop elektronov (elektronska puška »Gemini« s poljsko emisijo elektronov pri pospeševalni napetosti 1 kV), ki potuje po površini preparata. Ob tem prihaja do izbijanja sekundarnih elektronov s površine preparata, ki jih zazna detektor. Ojačan signal sekundarnih elektronov potuje v katodno cev, kjer ga z deflektorjem v mikroskopu usklajen sistem vodi na površino ekrana.

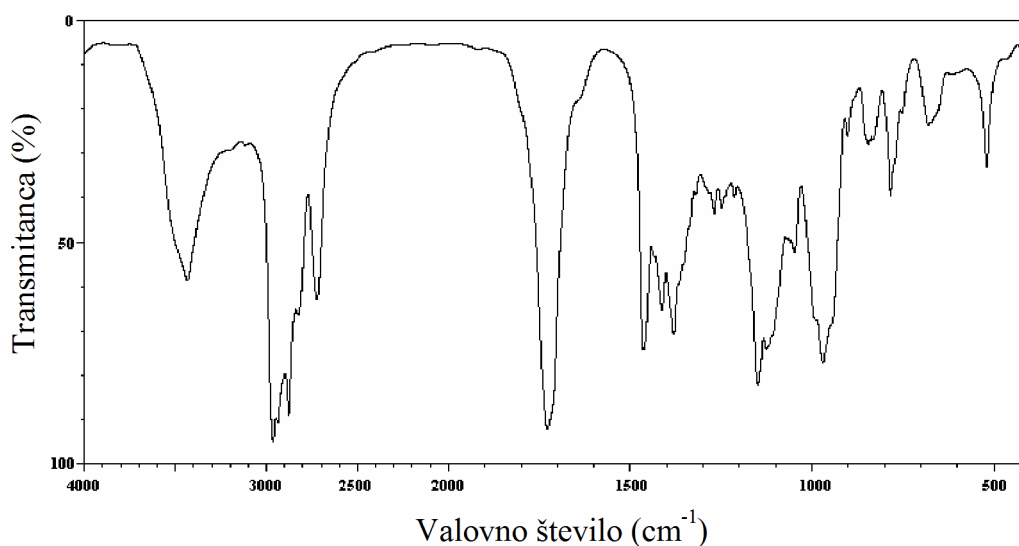
3.3.2.7 Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in posameznimi kapsulacijskimi sistemi

Značilnosti termičnih prehodov EGCG v prosti obliki ter kapsuliranega v liposome in mikrodelce smo preučevali z diferencialno dinamično kalorimetrijo (DSC). Metoda DSC temelji na primerjalnem načinu merjenja, kjer vzorce primerjamo z referenco, ki v danem temperaturnem območju ne doživi nobenih sprememb. Referenco običajno predstavlja inertni material, npr. aluminij. Referenca in vzorec imata med segrevanjem ves čas enako temperaturo. Pri tem merimo toplotno energijo, ki je potrebna, da med vzorcem in referenco ne pride do temperaturnih razlik, in je enaka toploti, ki se porablja ali sprošča pri kemijskih reakcijah ali faznih prehodih v vzorcu. Rezultat meritve DSC predstavlja krivulja toplotnega toka v odvisnosti od temperature ali časa.

DSC meritve smo naredili na inštrumentu Mettler Toledo DSC 1 (Švica) v temperaturnem območju od 20 °C do 300 °C s segrevanjem 10 K/min v dinamični argonovi atmosferi s pretokom 100 ml/min. 2-3 mg vzorcev smo zatehtali (tehtnica Mettler Toledo MX5, Švica) v 40 µl aluminijaste talilne lončke ter jih pokrili s preluknjanim pokrovčkom. Kot referenco smo uporabili prazen talilni lonček. Meritve smo opravili na naslednjih vzorcih: EGCG, liposomi, liposomi s kapsuliranim EGCG, hitozan, alginat, mikrodelci iz alginata ali hitozana

s kapsuliranim EGCG, mikrodelci iz alginata ali hitozana z liposomi, mikrodelci iz alginata ali hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG.

Interakcije med EGCG in komponentami kapsulacijskih sistemov smo preučevali z meritvami infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo (FTIR). V nasprotju s spektroskopijo v vidnem in UV območju pri infrardeči (IR) spektroskopiji opazujemo več absorpcijskih trakov različnih intenzitet. Absorpcijski IR-spektri so običajno kompleksni in značilni za vsako skupino. Primer absorpcijskega IR-spektra je prikazan na sliki 14. Ordinatna os običajno predstavlja prepustnost svetlobe oziroma transmitanco, na abscisni osi pa so nanesena valovna števila.

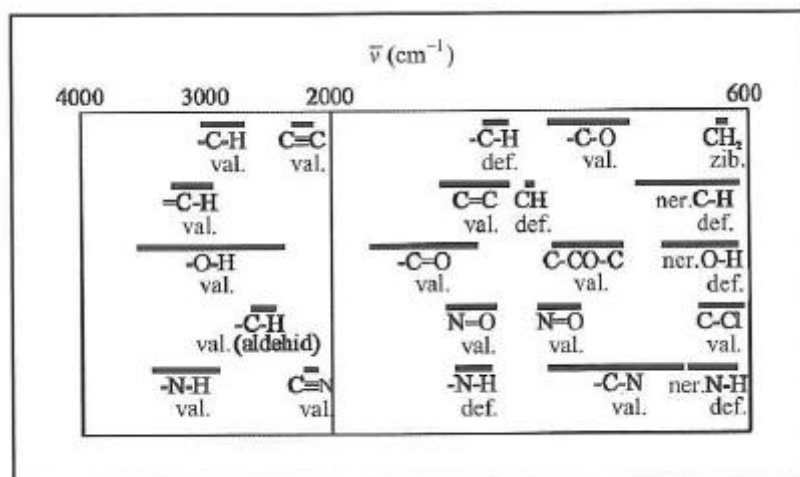


Slika 14: Primer absorpcijskega IR-spektra (butanal) (Hunt, 2016).
Figure 14: An example of IR-spectrum (butanal) (Hunt, 2016).

Z IR-spektroskopijo analiziramo spojine na dva načina: s spektralno interpretacijo in s primerjanjem absorpcijskih IR-spektrov s spektri znanih spojin. S spektralno interpretacijo posameznim trakovom pripišemo ustrezne vezi med atomi v molekuli. Na ta način določimo, katere funkcionalne spojine so prisotne v molekuli. To ugotavljamo v območju valovnih števil funkcionalnih skupin med 3600 cm^{-1} in 1200 cm^{-1} . Pri primerjavi absorpcijskih spektrov s spektri znanih spojin je pomembno območje valovnih števil od 1200 cm^{-1} do 600 cm^{-1} , ki ga imenujemo tudi »prstni odtis« molekule. Ta del spektra kot celota je značilen za posamezne spojine (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007).

Za interpretacijo IR-spektrov uporabljamo korelacijske diagrame ali preglednice. Primer preprostega korelacijskega diagrama je prikazan na sliki 15. Horizontalne črte označujejo področje valovnih števil, v katerem najdemo možna nihanja določenih skupin. Natančnejše informacije dobimo iz preglednic, ki podajajo valovna števila, značilna za posamezne

skupine. Preglednica 6 prikazuje značilna valovna števila nekaterih skupin atomov. Poleg lege absorpcijskih trakov moramo pri interpretaciji upoštevati tudi njihovo intenziteto in obliko.



Slika 15: Korelacijski diagram nekaterih funkcionalnih skupin; val. = valenčno nihanje, ner. = neravninsko nihanje, def. = deformacijsko nihanje, zib. = zibno nihanje (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007).

Figure 15: Correlation diagram of functional groups, val. = stretching, ner. = out of plane, def. = bending, zib. = rocking (Klofutar and Rudan-Tasič, 2007).

Preglednica 6: Primeri skupin atomov in njihova značilna valovna števila; val. = valenčno nihanje, def. = deformacijsko nihanje (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007).

Table 6: Examples of atom groups and their characteristic wavenumbers; val. = stretching, def. = bending (Klofutar and Rudan-Tasič, 2007).

Skupina	Območje valovnega števila (cm ⁻¹)	Skupina	Območje valovnega števila (cm ⁻¹)
C-H val.	2840-3000	N-H val.	3100-3520
C-H def.	1400-1470	N-H def.	1515-1655
O-H val.	2500-3650	C=C val.	1400-1680
O-H def.	650-920	C≡C val.	2100-2260

Infrardeče spektre EGCG in posameznih komponent kapsulacijskih sistemov smo posneli s spektrofotometrom Spectrum BX FTIR Perkin-Elmer (ZDA). Ustrezno količino vzorca v obliki prahu smo nanjali na mizico ter posneli spekter od 4000 cm⁻¹ do 500 cm⁻¹ z ločljivostjo 4 cm⁻¹ pri 25 °C. Meritve smo opravili na naslednjih vzorcih: EGCG, liposomi, liposomi s kapsuliranim EGCG, hitozan, alginat, mikrodelci iz alginata ali hitozana s kapsuliranim EGCG, mikrodelci iz alginata ali hitozana z liposomi, mikrodelci iz alginata ali hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG.

3.3.3 Priprava alginatnih submikronskih delcev in kapsulacija EGCG

V tretjem delu raziskave smo se ukvarjali z optimizacijo priprave alginatnih submikronskih delcev z metodo emulzifikacije (Paques in sod., 2012). Uspešnost priprave delcev smo

ugotavljali s SEM. Delce smo okarakterizirali na podlagi kapsulacije EGCG: določili smo učinkovitost kapsulacije, spremljali sproščanje EGCG ter z meritvami DSC in FTIR preučevali interakcije med EGCG in alginatnimi delci.

3.3.3.1 Priprava alginatnih submikronskih delcev

Alginatne submikronske delce smo pripravili z metodo emulzifikacije in premreževanja notranje faze, kot opisujejo Paques in sod. (2013). Najprej smo pripravili nanodelce iz CaCl_2 . V rastlinskem olju smo raztopili emulgator poliglicerol poliricinoleat (PGPR) tako, da je bila končna koncentracija emulgatorja v olju 3 % (m/m). Dodali smo 0,1 M raztopino $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ v 96 % etanolu do končne koncentracije 5 % (m/m). Mešanico smo homogenizirali z rotor-stator homogenizatorjem Micra D-9 (Micra, Nemčija) 1 min pri 16000 obr/min. Nastalo emulzijo smo mešali preko noči na magnetnem mešalu ter na ta način omogočili izhlapevanje etanola in nastanek nanodelcev CaCl_2 .

V naslednjem koraku smo pripravili submikronske alginatne delce brez in s kapsuliranim EGCG. Za prazne submikronske delce smo pripravili 1,0 % (m/m) in 2,0 % (m/m) raztopino alginata, ki smo jo dodali v oljno fazo (rastlinsko olje s 6 % (m/m) PGPR) do končne koncentracije 15 % (m/m). Mešanico smo homogenizirali z rotor-stator homogenizatorjem 2 min pri 11000 rpm. Tako pripravljeno emulzijo smo zmešali z oljno fazo, ki je vsebovala nanodelce CaCl_2 , v razmerju 1:2 in 1:3. Mešanico smo mešali na magnetnem mešalu preko noči in s tem omogočili, da so se nanodelci CaCl_2 absorbirali na površino alginatnih kapljic ter se v njih raztopili. Na ta način je prišlo do geliranja alginatnih kapljic ter nastanka submikronskih delcev. Submikronske delce smo ločili iz emulzije s centrifugiranjem 30 min pri 13000 g. Ostanke olja smo odstranili s spiranjem delcev v heksanu; delce smo resuspendirali v 10 ml heksana ter jih centrifugirali 10 min pri 4000 obr/min. Postopek spiranja smo ponovili trikrat ter po zadnjem spiranju delce posušili na zraku. Tako pripravljene delce smo za analize SEM, FTIR in DSC resuspendirali v destilirani vodi, zamrznili v tekočem dušiku ter posušili z liofilizacijo (Christ Alpha 1-2 LD, Nemčija) pri pogojih $-50\text{ }^\circ\text{C}$ in 0,056 mbar za 48 h. V primeru kapsulacije EGCG smo pred pripravo emulzije alginata v olju v raztopino alginata dodali EGCG do končne koncentracije 1 mg/ml.

3.3.3.2 Spiranje alginatnih submikronskih delcev

Testirali smo postopek spiranja alginatnih submikronskih delcev brez uporabe organskih topil (heksana). Za lažjo oceno učinkovitosti odstranjevanja oljne faze smo olje obarvali z oranžnim barvilom Sudan II, tako da je bila koncentracija barvila v olju 0,5 mg/ml. S tako obarvanim oljem smo pripravili alginatne delce po postopku, opisanem v točki 3.3.3.1. Alginatne submikronske delce smo ločili iz oljne faze s centrifugiranjem 30 min pri 3000 g.

Oljno fazo smo odlili ter ostanke olja skušali odstraniti s spiranjem delcev z enim od naslednjih topil: 70 % etanol, 50 % etanol, 20 % etanol, destilirana voda. Delce smo resuspendirali v topilih s pomočjo ultrazvočne kopeli ter jih nato ponovno zbrali s centrifugiranjem 30 min pri 14000 g. Postopek spiranja smo ponovili trikrat. Glede na vizualna opažanja smo ocenili, katero topilo omogoča najbolj učinkovito spiranje delcev.

3.3.3.3 Morfologija alginatnih submikronskih delcev

Morfologijo alginatnih submikronskih delcev smo preučevali s SEM (točka 3.3.2.6). Poleg liofiliziranih delcev smo opazovali tudi delce, sušene na zraku. V tem primeru smo po spiranju s heksanom delce ponovno resuspendirali v sveži destilirani vodi. Kapljico suspenzije s submikronskimi delci smo kanili na membranski filter z velikostjo por 0,24 μm (Millipore, ZDA) ter s pomočjo vakuumske filtrirne naprave odstranili vodo. Delce, ujeete na filtru, smo sprali z nekaj kapljicami destilirane vode ter filter posušili na zraku. Porazdelitev velikosti alginatnih delcev ter alginatnih delcev s kapsuliranim EGCG smo ocenili na podlagi slik SEM z uporabo programske opreme Image J (Ighathinathane in sod., 2008; Murawsaka in sod., 2013).

3.3.3.4 Določanje učinkovitosti kapsulacije EGCG in vsebnosti komponente v alginatnih submikronskih delcih

Učinkovitost kapsulacije smo določali posredno z merjenjem koncentracije ne-kapsuliranega EGCG v oljni fazi. EGCG smo ekstrahirali iz oljne faze po modificirani metodi ekstrakcije lipidov, ki jo opisujeta Bligh in Dyer (1956). 100 μl olja smo resuspendirali v mešanici 1000 μl metanola in 800 μl vode. Suspenziji smo dodali 1000 μl kloroforma ter mešanico 2 min mešali na vrtinčniku. Pri tem se je olje raztopilo v kloroformu, EGCG pa je prešel v fazo metanol:voda. Po ločitvi faz smo pomerili absorbanco zgornje faze (voda:metanol) pri 273 nm ter na podlagi absorbanc standardnih raztopin z znanimi koncentracijami EGCG (od 5 do 100 $\mu\text{g/ml}$; $R^2 = 0,999$) določili njegovo koncentracijo v vzorcih. Učinkovitost kapsulacije (UK) in vsebnost komponente (VK) smo izračunali z uporabo enačb 9 in 10 (točka 3.3.2.4)

3.3.3.5 Sproščanje EGCG iz alginatnih submikronskih delcev s Fickovim modelom in linearnim modelom superimpozicije

Sproščanje EGCG iz alginatnih submikronskih delcev smo spremljali pri pH 1,2 (0,1 M HCl) in pH 7,2 (fosfatni puffer). 70 mg alginatnih delcev smo resuspendirali v 10 ml ustreznega pufra ter vzorce med konstantnim mešanjem inkubirali na 37 °C. Ob določenih časovnih

točkah smo vzorčili po 1 ml suspenzije ter centrifugirali 15 min pri 18000 g. Koncentracijo sproščenega EGCG smo določili z merjenjem absorbance supernatanta pri 273 nm.

Mehanizem transporta EGCG iz alginatnih submikronskih delcev smo ocenili s pomočjo linearnega modela superimpozicije, ki razlaga dejavnike tako Fickovega kot Case II transporta v hidrofilih nosilcih (Berens in Hopfenberg, 1978):

$$M_t = M_{t,F} + M_{t,R} \quad \dots (12)$$

$M_{t,F}$ in $M_{t,R}$ sta prispevka Fickovega transporta in relaksacijskega procesa ob času t . Fickov transport je opisan z naslednjo enačbo:

$$M_{t,F} = M_{\infty,F} \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 k_F t) \right] \quad \dots (13)$$

$M_{\infty,F}$ predstavlja sproščeno komponento v ravnotežnem stanju, k_F pa konstanto Fickove difuzije. Učinke relaksacije polimera lahko opišemo kot distribucijo relaksacijskih časov, od katerih vsak povzema enačbo kinetike prvega reda (Berens in Hopfenberg, 1978):

$$M_{t,R} = \sum_i M_{\infty,R} [1 - \exp(-k_{R_i} t)] \quad \dots (14)$$

M_{∞,R_i} predstavlja doprinos relaksacijskih procesov pri sproščanju komponente, k_{R_i} pa predstavlja relaksacijsko konstanto i -te stopnje. V večini primerov na transport komponent vpliva relaksacija enega samega polimera, zato lahko zgornjo enačbo poenostavimo z $i = 1$,

Linearni model superimpozicije, ki opisuje sproščanje komponent iz delcev, tako lahko opišemo z naslednjo enačbo:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = X \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \exp(-k_F t) \right] + (1 - X) [1 - \exp(k_R t)] \quad \dots (15)$$

X predstavlja delež komponente, ki se je sprostil s Fickovim transportom.

Za oceno mehanizma sproščanja EGCG iz alginatnih submikronskih delcev pri pH 1,2 in pH 7,2 smo eksperimentalne podatke analizirali z enačbami 13 in 15. Prileganje modelov podatkom smo naredili z nelinearno regresijsko analizo z uporabo programske opreme OriginPro 8.5. Za oceno prileganja modela opazovanim podatkom smo uporabili koeficient določenosti (R^2) in celotno napako (RMSE), kot opisujejo Pinheiro in sod. (2015). Vrednosti R^2 in vsoto kvadratov napak (SSE) smo dobili direktno iz programske opreme, RMSE pa smo izračunali iz kvadratnega korena vsote kvadratov napak, ki smo jo delili z regresijo stopenj prostosti. Natančnost ocenjenih parametrov smo ocenili s parametrom SHW % (angl.

»standardised halved width«), ki smo ga izračunali kot razmerje med 95 % standardne napake in ocenjeno vrednostjo.

3.3.3.6 Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in alginatnimi submikronskimi delci

Značilnosti termičnih prehodov alginatnih submikronskih delcev in EGCG smo preučevali z DSC (točka 3.3.2.7). Meritve DSC smo opravili na naslednjih vzorcih: EGCG, alginat, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, alginatni submikronski delci in alginatni submikronski delci s kapsuliranim EGCG.

Interakcije med EGCG in alginatnimi submikronskimi delci smo preučevali s FTIR (točka 3.3.2.7). Posneli smo infrardeče spektre EGCG ter alginatnih submikronskih delcev brez in s kapsuliranim EGCG.

3.3.4 Kapsulacija soka granatnega jabolka

V četrtem delu smo se ukvarjali z vgradnjo soka granatnega jabolka v polisaharide alginat, pektin, hitozan in pululan z metodo liofilizacije. Liofilizacija je proces dehidracije, ki se uporablja zlasti za stabilizacijo temperaturno občutljivih materialov in arom. Nosilni material in aktivno komponento raztopimo v vodi ter zamrzemo pri temperaturah med $-90\text{ }^\circ\text{C}$ in $-40\text{ }^\circ\text{C}$. Tako pripravljene vzorce posušimo z direktno sublimacijo pri nizkem tlaku in temperaturah med $-90\text{ }^\circ\text{C}$ in $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Produkt liofilizacije so krhke strukture, ki jih lahko nadalje zdrobimo oziroma zmeljemo v manjše delce, ki so običajno nepravilnih oblik. Liofilizirane vzorce soka in polisaharidov smo okarakterizirali glede na morfologijo, učinkovitost kapsulacije ter stabilnost med inkubacijo pri $60\text{ }^\circ\text{C}$, pri čemer smo spremljali vsebnost celokupnih fenolnih spojin in antocianinov, antioksidativno aktivnost ter parametre CIE $L^*a^*b^*$. Liofilizirane vzorce soka granatnega jabolka in polisaharidov smo dodali tudi v jogurt in spremljali stabilnost bioaktivnih komponent med shranjevanja jogurta pri $4\text{ }^\circ\text{C}$.

V raziskavi smo uporabili granatna jabolka sorte Wonderfull z državo porekla Izrael. Sok granatnega jabolka smo iztisnili iz arilov ter prefiltrirali preko gaze. Do uporabe smo sok skladiščili pri temperaturi $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.4.1 Določanje antocianinov v soku granatnega jabolka s HPLC

Antocianine v soku granatnega jabolka smo določili s HPLC (1260 Infinity; Agilent Technologies, ZDA) s kolono Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, ZDA; $4,6 \times 150,0\text{ mm} \times 3,5\text{ }\mu\text{m}$). Mobilna faza je bila sestavljena iz 3 % mravljične kisline (A) in

mešanice acetonitrila in metanola v volumskem razmerju 85:15 (B). Izpiranje je potekalo po linearnem gradientu, kot je prikazano v preglednici 7. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 0,8 ml/min ter smo jo v 25 min povečali na 1,0 ml/min. Antocianine smo detektirali v območju valovnih dolžin od 200 do 600 nm. Analize so potekale pri temperaturi 40 °C.

Preglednica 7: Časi izpiranja in deleži mobilne faze A pri metodi določanja antocianinov v soku granatnega jabolka s HPLC.

Table 7: Elution times and composition of mobile phase A for determination of anthocyanins in pomegranate juice with HPLC.

Čas izpiranja (min)	A (%)
0-13	95-92
13-25	92-91
25-45	91-87
45-46	87-0
46-48	0
48-49	0-95
49-55	95

Antocianine v soku granatnega jabolka smo identificirali s primerjavo retencijskih časov posameznih vrhov z retencijskimi časi naslednjih standardov: cianidin-3-arabinozid, cianidin-3-glukozid, cianidin-3,5-diglukozid, delfinidin-3-glukozid, delfinidin-3,5-diglukozid, pelargonidin-3-glukozid in pelargonidin-3,5-diglukozid. Standarde antocianinov smo raztopili v 3% (v/v) mravljični kislini do končne koncentracije 0,5 mg/ml.

3.3.4.2 Priprava liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti polisaharidov

Suspenzije soka granatnega jabolka smo pripravili v kombinaciji s polisaharidi hitozan, alginat, pektin in pululan v naslednjih masnih razmerjih soka in izbranega polisaharida: 66,7:1; 50:1 ter 25:1. Mešanice soka in polisaharida smo homogenizirali z rotor-stator homogenizatorjem 1 min pri 11000 obr/min. Tako pripravljene suspenzije smo centrifugirali 10 min pri 3500 obr/min ter supernatant prenesli v sveže centrifugirke. Vzorce smo zamrznili v tekočem dušiku ter liofilizirali (Christ Alpha 1-2 LD, Nemčija) 48 h pri -50 °C in 0,056 mbar. Liofilizirane vzorce smo nadalje homogenizirali v terilnici s pomočjo tekočega dušika. Kot kontrolo smo uporabili sok brez dodanih polisaharidov, s katerim smo postopali enako kot v primeru priprave liofiliziranih vzorcev. Tako pripravljene vzorce smo do nadaljnje uporabe pri -20 °C.

3.3.4.3 Določanje vsebnosti celokupnih fenolnih spojin

Celokupne fenolne spojine v soku ter v liofiliziranih vzorcih smo določili z metodo, ki jo opisujeta Singleton in Rossi (1965) in temelji na redukciji reagenta Folin-Ciocalteau v prisotnosti natrijevega karbonata (Na_2CO_3) in fenolnih spojin. Pri tem nastane modro obarvan

kompleks, ki ga detektiramo z merjenjem absorbance pri 765 nm. Umeritveno krivuljo smo pripravili z uporabo 0,2 mg/ml klorogenske kisline v 50 % metanolu. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali ustrezen volumen raztopine klorogenske kisline, tako da je bila končna masa klorogenske kisline od 0,001 mg do 0,04 mg, ter dodali 50 % metanol do končnega volumna 200 μ l. Nato smo dodali 1 ml reagenta Folin-Ciocalteu ter 800 μ l 7,5 % raztopine Na₂CO₃. Vzorce smo inkubirali 30 min ter nato izmerili absorbanco pri 765 nm. Na podlagi absorbance in mase klorogenske kisline smo pripravili umeritveno krivuljo ($R^2 = 0,997$). Vsebnost fenolnih spojin v soku in v liofiliziranih vzorcih smo izražali v ekvivalentih klorogenske kisline v mg/l vzorca (prirejeno po Terpinc, 2006).

Za določanje fenolnih spojin v soku smo uporabili 50 μ l 10-krat redčenega soka ter dodali 50 % metanol do končnega volumna 200 μ l. V nadaljevanju smo postopali kot v primeru priprave umeritvene krivulje. Za določanje celokupnih fenolnih spojin v liofiliziranih vzorcih smo uporabili metodo ekstrakcije, ki jo opisujejo Saénz in sod. (2009) z manjšimi modifikacijami. V mikrocentrifugirko smo zatehtali 100 mg liofiliziranih vzorcev ter dodali 1 ml mešanice etanola, očetne kisline in vode v razmerju 50: 8: 42. Suspenzije smo mešali na vrtinčniku 1 min ter sonicirali v ultrazvočni kopeli dvakrat po 15 min. Vzorce smo centrifugirali 10 min pri 15000 g ter supernatant prefiltrirali (0,45 μ m filter; Millipore, ZDA). Za določanje fenolnih spojin smo uporabili 50 μ l 10-krat redčenih vzorcev ter dodali ostale reagente, kot je opisano v primeru priprave umeritvene krivulje.

3.3.4.4 Določanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativno aktivnost smo merili z reagentom DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (Brand-Williams in sod., 1995). V obliki radikala ima DPPH absorpcijski maksimum pri 515 nm in je vijolično obarvan. Ob reakciji z antioksidantom prihaja do redukcije DPPH in s tem do spremembe barve iz vijolične v rumeno. Zmanjšanje absorbance pri 515 nm je sorazmerno s koncentracijo antioksidantov v vzorcu.

Za določanje antioksidativne aktivnosti liofiliziranih vzorcev smo sprva izolirali celokupne fenolne spojine, kot je opisano v točki 3.3.4.3. Tako sok granatnega jabolka kot izvlečke polifenolnih spojin liofiliziranih vzorcev smo za določanje antioksidativne aktivnosti 10-krat redčili z bidestilirano vodo. 50 μ l redčenih vzorcev smo zmešali s 1950 μ l 0,1 mM metanolne raztopine DPPH. Vzorce smo inkubirali v temi pri 25 °C 30 min ter nato izmerili absorbanco pri 515 nm. Iz izmerjenih absorbanco smo po enačbi 16 izračunali delež inhibicije prostih radikalov:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [A_{t=0} - A_{t=30}] \times 100 \quad \dots (16)$$

Kjer $A_{t=0}$ pomeni absorpcijo vzorca ob začetnem času, $A_{t=30}$ pa absorpcijo po 30 min. Višji delež inhibicije prostih radikalov pomeni boljše antioksidativno aktivnost.

3.3.4.5 Določanje vsebnosti celokupnih antocianinov

Antocianine smo določali s pH-diferencialno metodo, ki jo opisujejo Lee in sod. (2005) in temelji na strukturni transformaciji antocianinov ob spremembi pH. Pri pH 1,0 so antocianini v obliki oksonijevega iona (flavilijev kation) in so obarvani v odtenkih od oranžne do vijoličaste, pri pH 4,5 pa je prevladujoča hemiketalna oblika antocianinov (karbinol psevdobaza), ki je brez barve. Razlika v absorbanci pri 520 nm je proporcionalna koncentraciji celokupnih antocianinov. Rezultate vsebnosti antocianinov podajamo kot ekvivalente cianidin-3-glukozida. Razgrajeni antocianini v obliki polimerov niso podvrženi spremembi barve ob spremembi pH in jih s to metodo ne detektiramo.

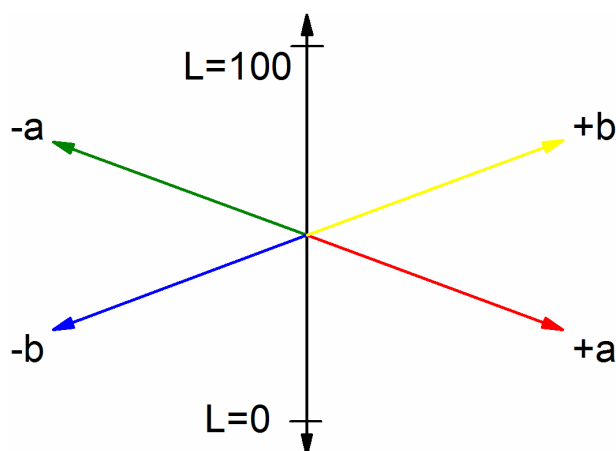
Za določanje celokupnih antocianinov v soku smo uporabili 10-kratno redčitev soka. Za določanje antocianinov v liofiliziranih vzorcih smo sprva izolirali celokupne fenolne spojine, kot je opisano v točki 3.3.4.3. Vzorce smo nadalje 5-krat redčili s pufrom s pH 1,0 (2,5 mM KCl; pH smo uravnali na 1,0 ($\pm 0,05$) s HCl) ter s pufrom s pH 4,5 (0,4 M CH_3COONa ; pH smo uravnali na 4,5 ($\pm 0,05$) s HCl). Po 20 min inkubaciji smo izmerili absorbanco vzorcev pri 520 nm in 700 nm. Absorbanco pri 700 nm smo merili z namenom korekcije motnosti vzorca. Koncentracijo antocianinov smo izračunali po enačbi 17:

$$\text{Antocianini (ekvivalenti cianidin - 3 - glukozida; } \frac{\text{mg}}{\text{L}}) = \frac{A M R F 10^3}{\epsilon l} \quad \dots (17)$$

kjer je A - absorbanca vzorca ($A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$), M - molekulska masa cianidin-3-glukozida ($M = 449,2 \text{ g/mol}$), RF - redčitveni faktor ($\text{RF} = 5$), l - dolžina poti svetlobe ($l = 1$), ϵ - molarni ekstinkcijski koeficient cianidin-3-glukozida ($\epsilon = 26900 \text{ L}/(\text{mol cm})$) in 10^3 faktor pretvorbe g v mg.

3.3.4.6 Merjenje barve liofiliziranega soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka s polisaharidi

Barvo vzorcev smo analizirali s prenosnim kolorimetrom (CR-10 Chroma; Minolta, Osaka, Japonska), s katerim smo določali parametre barvnega prostora CIE $L^*a^*b^*$ (slika 16). Parameter L^* predstavlja svetlost; njegove vrednosti segajo od 0 (črna) do 100 (bela). Pozitivne vrednosti parametra a^* predstavljajo rdečo barvo in negativne zeleno, medtem ko pozitivne vrednosti parametra b^* predstavljajo rumeno barvo in negativne modro. Bolj ko sta parametra a^* oziroma b^* velika v pozitivno ali negativno smer, bolj je barva nasičena (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007).



Slika 16: Ponazoritev barvnega prostora CIE L*a*b* (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007).
Figure 16: Illustration of the CIE L*a*b* colour space (Klofutar and Rudan-Tasič, 2007).

Liofiliziran sok granatnega jabolka ter liofilizirane vzorce soka in različnih polisaharidov smo prenesli na predmetno mikroskopsko steklo ter pokrili s krovnim steklom. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali v temi pri 60 °C ter ob v naprej določenih časovnih točkah pomerili parametre barvnega prostora L*, a* in b*. Celokupno spremembo barve smo izračunali po enačbi 18 (Cilek in sod., 2012):

$$\Delta E = \sqrt{(L_t^* - L_0^*)^2 + (a_t^* - a_0^*)^2 + (b_t^* - b_0^*)^2} \quad \dots (18)$$

L₀*, a₀* in b₀* predstavljajo vrednosti parametrov pred pričetkom inkubacije pri 60 °C, L_t*, a_t* in b_t* pa predstavljajo vrednosti parametrov ob času inkubacije t.

Parameter C* (angl. »chroma«) predstavlja nasičenost. Bolj ko je parameter C* velik, bolj je barva nasičena (Klofutar in Rudan-Tasič, 2007). Parameter C* smo izračunali po enačbi 19:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \dots (19)$$

Indeks rjave barve (BI; angl. »browning index«) predstavlja čistost rjave barve in je pomemben parameter pri opisovanju encimatskih in neencimatskih procesov, kjer nastajajo rjavo obarvani produkti (Guerrero in sod., 1996; Ferrari in sod., 2010). BI smo izračunali po enačbi 20:

$$BI = \frac{100(x-0,31)}{0,172} \quad \dots (20)$$

kjer je x podan z enačbo 21:

$$x = \frac{a^* + 1,75L^*}{5,645L^* + a^* - 3,012b^*} \quad \dots (21)$$

3.3.4.7 Učinkovitost kapsulacije

Učinkovitost vgradnje je predstavljalo razmerje med vgrajenimi fenolnimi spojinami in celokupnimi fenolnimi spojinami. Vgrajene fenolne spojine smo določili kot razliko med celokupnimi fenolnimi spojinami (točka 3.3.4.3) in fenolnimi spojinami na površini liofiliziranih vzorcev. Za določanje površinskih polifenolnih spojin smo uporabili metodo, ki jo opisujejo Saénz in sod. (2009). 100 mg liofiliziranih vzorcev smo dispergirali v 1 ml mešanice etanola in metanola v razmerju 1:1. Vzorce smo mešali na vrtničniku 1 min ter centrifugirali 10 min pri 15000 g. Supernatant smo prefiltrirali (0,45 µm filter; Millipore, ZDA) ter za določanje fenolnih spojin uporabili 50 µl neredčenih izvlečkov. Učinkovitost kapsulacije (UK) smo izračunali po enačbi 22:

$$UK (\%) = \frac{\text{masa celokupnih fenolnih spojin} - \text{masa površinskih fenolnih spojin}}{\text{masa celokupnih fenolnih spojin}} \times 100 \quad \dots (22)$$

3.3.4.8 Morfologija liofiliziranih vzorcev

Morfologijo liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom v masnih razmerjih 50:1 in 25:1 smo opazovali s SEM (točka 3.3.2.6).

3.3.4.9 Test stabilnosti

Stabilnost liofiliziranih vzorcev smo preučevali pri temperaturi 60 °C v odsotnosti svetlobe v obdobju 7 dni. Približno 100 mg liofiliziranih vzorcev smo zatehtali v mikrocentrifugirke ter jih shranili v inkubatorju s kontrolirano temperaturo 60 °C. Ob v naprej določenih časovnih točkah smo vzeli po 2 mikrocentrifugirki ter vzorce okarakterizirali na podlagi celokupnih polifenolnih spojin (točka 3.3.4.3), antioksidativne aktivnosti (točka 3.3.4.4), vsebnosti antocianinov (točka 3.3.4.5) ter na podlagi parametrov barvnega prostora CIE L*a*b* (točka 3.3.4.6). Kot kontrolo smo uporabili liofiliziran sok granatnega jabolka brez dodanih polisaharidnih nosilcev.

3.3.4.10 Stabilnost liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka s polisaharidi v jogurtu

Spremljali smo vpliv dodanih polisaharidnih nosilcev na stabilnost soka granatnega jabolka v jogurtu. Liofilizirane vzorce soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom v masnih razmerjih 50:1 in 25:1 smo zamešali v naravni tekoči jogurt s 3,2 % mlečne maščobe (Mu, Ljubljanske mlekarne) do končne koncentracije 10 % (m/m) (Coisson in sod., 2005). Liofilizirane vzorce smo dispergirali v jogurtu z rotor stator homogenizatorjem (15 s, 11000 obr/min). Poleg jogurta z liofiliziranimi vzorci smo pripravili tudi jogurt, kateremu smo dodali liofiliziran sok brez dodanih polisaharidov ter jogurt brez dodatkov. Vzorce smo

inkubirali pri 4 °C v temi 1 mesec. Ob v naprej določenih časovnih točkah smo vzorčili po 1 g jogurta ter dodali po 1 ml mešanice etanola, oetne kisline in vode v razmerju 50: 8: 42 (Saénz in sod., 2009). V nadaljnjih korakih smo postopali enako kot v primeru izolacije celokupnih fenolnih spojin iz liofiliziranih vzorcev (točka 3.3.4.3). Pridobljene izvlečke smo okarakterizirali na podlagi vsebnosti celokupnih fenolnih spojin (točka 3.3.4.3), antioksidativne aktivnosti (točka 3.3.4.4) ter vsebnosti antocianinov (točka 3.3.4.5).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDOV

Pri izbiri ogrodnih materialov za kapsulacijo katehinov in izvlečkov granatnega jabolka smo se osredotočili na materiale iz vrst naravnih polisaharidov. Z namenom, da bi pred poskusi kapsulacije dobili vpogled v določene fizikalno-kemijske lastnosti polisaharidov, smo v prvem delu doktorske naloge raztopine izbranih polisaharidov (alginat (A2158), alginat (A1112), pektin, hitozan, pululan) v koncentracijah 0,5 %; 1,0 %; 1,5 % in 2,0 % (m/m) okarakterizirali na podlagi meritev gostote, viskoznosti, površinske napetosti in električne prevodnosti. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 8.

Na podlagi gostot raztopin polisaharidov smo določili njihovo viskoznost. Viskoznost raztopin polisaharidov se eksponentno povečuje s koncentracijo polisaharidov, zlasti v primeru alginata (A2158), hitozana in pektina. Rezultati so pričakovani, saj omenjene polisaharide uvrščamo med hidrokoloide, ki že pri nizkih koncentracijah tvorijo visoko viskozne raztopine. Alginat (A1112) izkazuje znatno nižjo viskoznost v primerjavi z alginatom (A2158). Viskoznost raztopine alginata je poleg od koncentracije alginata odvisna tudi od njegove povprečne molekulske mase. Daljše kot so verige molekul alginata oziroma večja kot je povprečna molekulska masa, višja je viskoznost raztopine. Z različnimi postopki izolacije in predelave alginata lahko vplivamo na molekulske lastnosti alginata in posledično na lastnosti končnega produkta (FMC BioPolymer, 2003). V primeru pululana je vpliv koncentracije raztopine skoraj zanemarljiv. Viskoznost raztopine pululana ne preseže 0,010 Pa s niti v primeru 2,0 % raztopine.

Testirani polisaharidi v vodni raztopini delujejo kot površinsko aktivne snovi, saj znatno znižajo površinsko napetost v primerjavi s površinsko napetostjo destilirane vode (~73 mN/m) (Oliveira in sod., 2013). V primeru obeh alginatov in pektina se površinska napetost raztopin s povečevanjem koncentracije polisaharidov znižuje, medtem ko v primeru pululana in hitozana povečanje koncentracije polisaharidov iz 0,5 % na 2,0 % nima razvidnega vpliva na površinsko napetost raztopin.

Električna prevodnost raztopin polisaharidov narašča linearno v odvisnosti od koncentracije. Do najbolj izrazitega porasta prevodnosti pride pri obeh tipih alginata in pri hitozanu, kar sovпада tudi z njuno lastnostjo tvorbe močnih gelov v prisotnosti nasprotno nabitih ionov. Pululan v vodi ne disociira in posledično imajo njegove raztopine nizko električno prevodnost (Leathers, 2003).

Preglednica 8: Gostota, viskoznost, površinska napetost in prevodnost raztopin polisaharidov različnih koncentracij.

Table 8: Density, viscosity, surface tension and conductivity of polysaccharide solutions at different concentration levels.

	Koncentracija (m/m) (%)	Gostota (g/cm ³)	Viskoznost (Pa s)	Površinska napetost (mN/m)	Prevodnost (μS/cm)
Alginat (A2158)	0,5	0,99961 (± 0,00001)	0,0068 (± 0,0001)	50,2 (± 0,3)	1217,3 (± 0,7)
	1,0	1,00218 (± 0,00001)	0,01750 (± 0,00001)	47,1 (± 0,5)	2327,0 (± 0,7)
	1,5	1,00484 (± 0,00001)	0,03944 (± 0,00003)	45,5 (± 0,2)	3384,1 (± 0,3)
	2,0	1,00742 (± 0,00001)	0,0826 (± 0,0001)	44,4 (± 0,3)	4430,00 (± 0,01)
Alginat (A1112)	0,5	0,99963 (± 0,00001)	0,00325 (± 0,00001)	48,4 (± 0,4)	1269,7 (± 0,5)
	1,0	1,00223 (± 0,00001)	0,00578 (± 0,00001)	47,4 (± 0,2)	2404,8 (± 0,6)
	1,5	1,00482 (± 0,00001)	0,01081 (± 0,00001)	46,2 (± 0,2)	3481,1 (± 0,3)
	2,0	1,00742 (± 0,00001)	0,01717 (± 0,00001)	43,4 (± 0,3)	4550,00 (± 0,01)
Pektin	0,5	0,99915 (± 0,00001)	0,00514 (± 0,00001)	57,2 (± 0,1)	614,1 (± 0,4)
	1,0	1,00122 (± 0,00001)	0,01341 (± 0,00001)	54,2 (± 0,1)	1156,00 (± 0,01)
	1,5	1,00302 (± 0,00001)	0,03072 (± 0,00003)	52,5 (± 0,2)	1666,00 (± 0,01)
	2,0	1,00549 (± 0,00001)	0,06787 (± 0,00008)	52,1 (± 0,2)	2155,2 (± 0,4)
Hitozan	0,5	1,00071 (± 0,00001)	0,01122 (± 0,00001)	51,4 (± 0,2)	1170,4 (± 0,5)
	1,0	1,00281 (± 0,00008)	0,03068 (± 0,00001)	51,2 (± 0,6)	2043,8 (± 0,4)
	1,5	1,00493 (± 0,00001)	0,0670 (± 0,0001)	50,1 (± 0,4)	2912,6 (± 0,5)
	2,0	1,00720 (± 0,00001)	0,1521 (± 0,0002)	53,2 (± 0,3)	3710,00 (± 0,01)
Pululan	0,5	0,99893 (± 0,00001)	0,00117 (± 0,00001)	54,1 (± 0,3)	132 (± 1)
	1,0	1,00082 (± 0,00001)	0,00150 (± 0,00001)	54,8 (± 0,3)	249 (± 1)
	1,5	1,00265 (± 0,00001)	0,00194 (± 0,00001)	57,6 (± 0,4)	359,8 (± 0,7)
	2,0	1,00468 (± 0,00001)	0,00246 (± 0,00001)	56,4 (± 0,2)	466,6 (± 0,5)

Na podlagi rezultatov meritev smo se v primeru kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG z mikrokapsulatorjem osredotočili na rabo alginata (A2158) in hitozana kot dveh nasprotno nabitih polielektrolitov. V primeru priprave alginatnih submikronskih delcev z metodo emulzifikacije smo uporabili alginat (A2158), pri pripravi liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka pa smo testirali uporabo vseh štirih vrst polisaharidov: alginat (A1112), pektin, hitozan in pululan.

4.2 MIKROKAPSULACIJA (\pm)-KATEHINA IN EGCG

V drugem delu raziskave smo se ukvarjali s kapsulacijo (\pm)-katehina in EGCG v mikrodelce iz alginata ali hitozana, pripravljene z metodo mikrokapsulacije. Za polisaharidne delce je značilna porozna struktura, posledica česar je hitra difuzija kapsuliranih snovi iz delcev v okoljsko raztopino. Z namenom, da bi upočasnili sproščanje kapsuliranih snovi, smo (\pm)-katehin in EGCG predhodno kapsulirali v liposome ter nato liposome vgradili v mikrodelce iz alginata ali hitozana. Preučevali smo sproščanje (\pm)-katehina in EGCG iz liposomov ter iz liposomov, vgrajenih v polisaharidne mikrodelce, pri različnih vrednostih pH. Z določanjem celokupne koncentracije (\pm)-katehina in EGCG v suspenzijah liposomov in mikrodelcev pri različnih vrednostih pH ter v sadnem nektarju smo ugotavljali vlogo kapsulacijskih sistemov pri zaščiti kapsuliranih snovi. Interakcije med kapsulacijskimi sistemi ter EGCG smo podrobneje preučili z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR).

4.2.1 Določanje velikosti liposomov in morfologija mikrodelcev

Povprečna velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial praznih liposomov ter liposomov s (\pm)-katehinom in EGCG so podani v preglednici 9. Povprečna velikost praznih liposomov je bila 200 (\pm 16) nm. Po kapsulaciji (\pm)-katehina se je velikost liposomov povečala za 1,3-krat, medtem ko se je po kapsulaciji EGCG velikost liposomov povečala za kar 4,3-krat. Povečanje liposomov po kapsulaciji (\pm)-katehina in EGCG opisujejo tudi Rashidinejad in sod. (2014), ki so v obeh primerih zaznali do 1,3-kratno povečanje liposomov, medtem ko Gibis in sod. (2013) opisujejo 3-kratno povečanje liposomov po kapsulaciji izvlečka grozdnih pečk.

Polidisperzni indeks se uporablja kot merilo za porazdelitev velikosti delcev. Prazni liposomi in liposomi s (\pm)-katehinom so imeli polidisperzni indeks 0,21 (\pm 0,01) oziroma 0,25 (\pm 0,01), kar kaže na monodisperznost liposomov. Polidisperzni indeks liposomov z EGCG je bil znatno večji (0,53 (\pm 0,01)), kar pomeni, da so bili v suspenziji prisotni liposomi različnih velikosti.

Zeta potencial je pokazatelj površinskega naboja delcev, ki odloča o odbojnih interakcijah kolooidov ter o njihovi stabilnosti. Zaradi boljše stabilnosti (\pm)-katehina in EGCG pri nižjih vrednostih pH smo liposome pripravljali v kislem mediju (0,1 % citronska kislina, pH = 3,4). Posledično so tako prazni liposomi kot liposomi s (\pm)-katehinom in EGCG izkazovali pozitiven zeta potencial. Nižja absolutna vrednost zeta potenciala (<30 mV) praznih liposomov in liposomov s kapsuliranim (\pm)-katehinom kaže na manjšo stabilnost koloidne disperzije, kar s časoma lahko vodi do koagulacije in flokulacije liposomov. Liposomi s kapsuliranim EGCG so imeli visok zeta potencial (60,8 (\pm 0,9) mV), na podlagi česar lahko sklepamo na večjo stabilnost koloide disperzije liposomov.

Preglednica 9: Povprečna velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial liposomov.

Table 9: Average size, polydispersity index and zeta potential of liposomes.

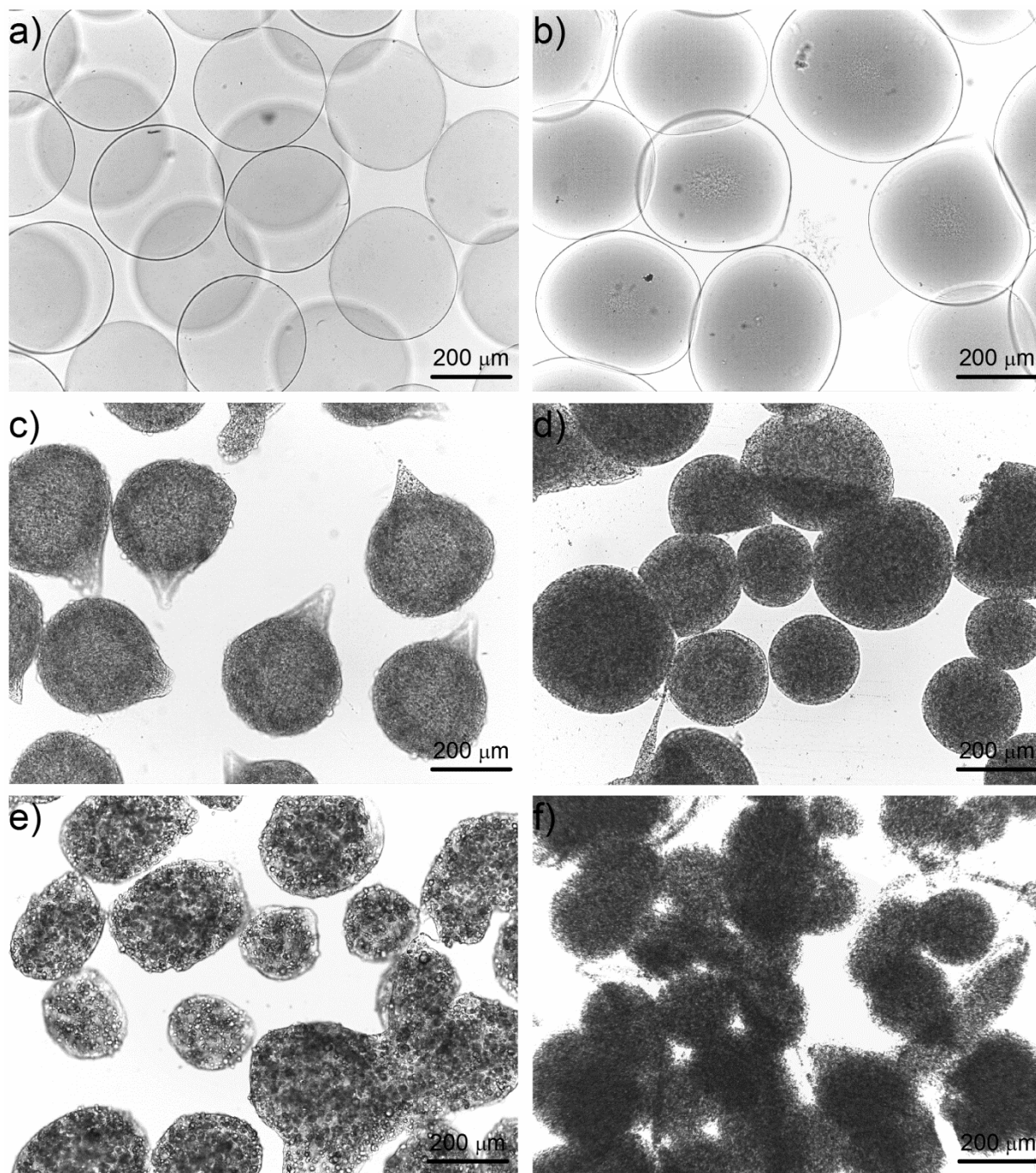
	Velikost (nm)	Polidisperzni indeks	Zeta potencial (mV)
Liposomi	200 (\pm 16)	0,210 (\pm 0,013)	22,6 (\pm 0,8)
Liposomi s (\pm)-katehinom	260 (\pm 10)	0,254 (\pm 0,009)	18,6 (\pm 0,3)
Liposomi z EGCG	860 (\pm 12)	0,530 (\pm 0,011)	60,8 (\pm 0,9)

Slike svetlobne mikroskopije mikrodelcev brez in s kapsuliranimi liposomi so prikazane na sliki 17. Na slikah 17a in 17b so prikazani prazni mikrodelci iz alginata oziroma hitozana, veliki 320 (\pm 10) μ m in 350 (\pm 20) μ m. Velikost delcev je bila pričakovana, saj je običajno končni premer alginatnih delcev približno dvakrat večji od premera šobe kapsulatorja (v našem primeru 150 μ m) (Whelehan in Marison, 2011). Vključitev liposomov v alginat oziroma hitozan je vplivala na tvorjenje kapljic ter na obliko in velikost končnih delcev. Slike svetlobne mikroskopije so pokazale več nepravilnosti; v primeru alginatnih mikrodelcev z liposomi s (\pm)-katehinom (slika 17c) so razvidni repki, ki lahko nastanejo kot posledica premočne sile, s katero kapljica polimera pade v utrjevalno raztopino (Mazzitelli in sod., 2008). Na sliki 17d so prikazani mikrodelci iz hitozana z liposomi s (\pm)-katehinom, kjer so poleg manjših delcev s premerom okrog 200 μ m prisotni tudi delci s še enkrat večjim premerom. Dvojna velikost delcev je lahko posledica zlivanja kapljic polimera v zraku, še preden dosežejo utrjevalno raztopino. Na slikah 17e in 17f so prikazani mikrodelci iz alginata ali hitozana z liposomi z EGCG. Rezultati meritev velikosti liposomov so pokazali, da so bili liposomi z EGCG kar 3,3-krat večji od liposomov s (\pm)-katehinom. Posledično so imeli liposomi z EGCG še večji vpliv na curek polimera in s tem na oblikovanje mikrodelcev. Poleg delcev nepravilnih oblik ter delcev z repki so bili prisotni tudi dvojni delci, ki nastanejo kot posledica zlitja kapljic polimera med vstopom v utrjevalno raztopino (Whelehan in Marison, 2011).

Mikrodelci v vodni suspenziji so imeli sferične oblike, ki pa so se med postopkom sušenja izgubile, kar kažejo slike SEM (slika 18). Groba in nagubana površina liofiliziranih delcev je lahko posledica neenakomernega procesa geliranja (Chan in sod., 2006). Ioni Ca^{2+} in TPP najprej zamrežijo površino kapljice, saj je to prva stična točka z utrjevalno raztopino.

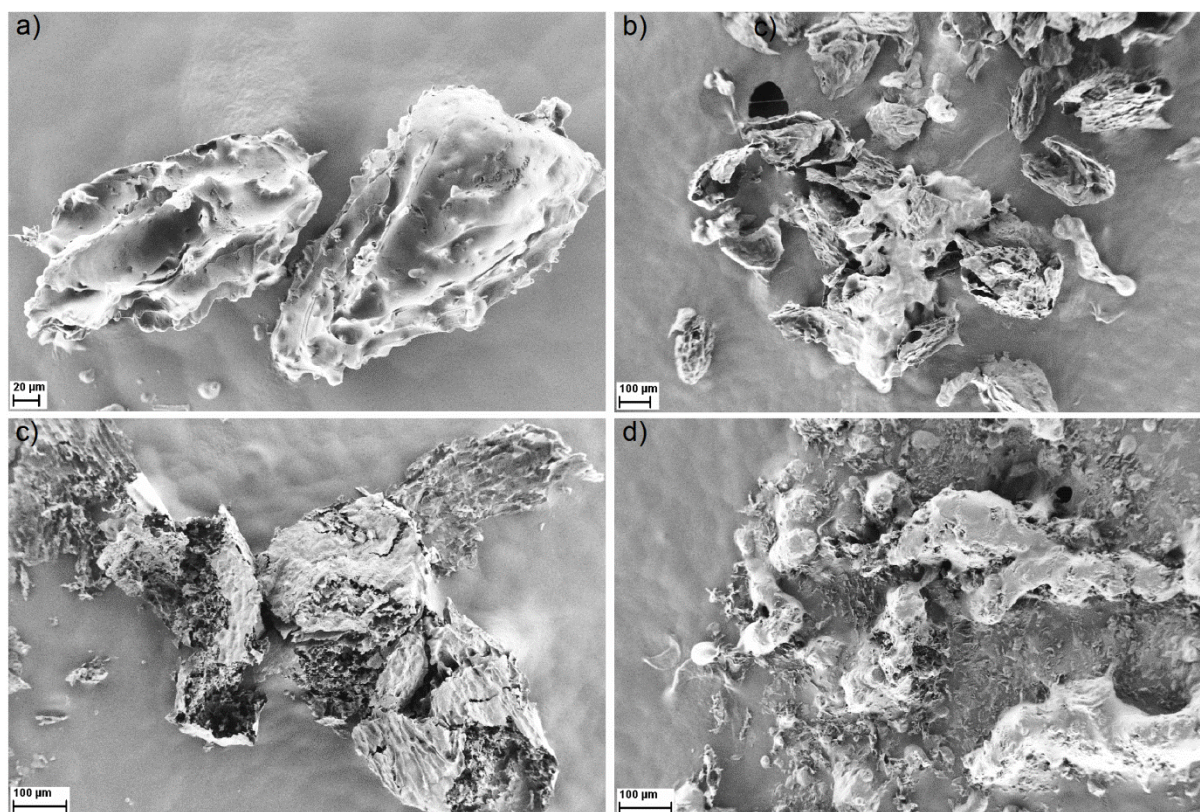
Povečana koncentracija ionov na površini kapljice/delca otežuje difuzijo ionov v notranjost. Končna struktura delcev je nehomogena s slabše zamreženo notranjostjo in dobro zamreženo površino. Homogena struktura delca je pomembna za enakomerno krčenje materiala med procesom sušenja in omogoča ohranitev gladke površine in pravilne oblike delca.

Kljub nepravilnim oblikam ter nagubani površini smo po liofilizaciji še vedno zaznali ločene delce, ki so ohranili svojo integriteto. Z namenom izolacije kapsuliranih komponent smo delce razbili s soniciranjem. Sliki 18b in 18d prikazujeta mikrodelce iz alginata ali hitozana po soniciranju. V primeru alginatnih mikrodelcev so bili po soniciranju v vzorcu še vedno prisotni ostanki sferičnih struktur, medtem ko so mikrodelci iz hitozana popolnoma razpadli, iz česar lahko sklepamo, da so imeli mikrodelci iz hitozana manjšo mehansko stabilnost v primerjavi z alginatnimi mikrodelci.



Slika 17: Slike svetlobne mikroskopije praznih mikrodlecev iz alginata ali hitozana (a, b), mikrodlecev iz alginata ali hitozana s kapsuliranimi liposomi s (\pm)-katehinom (c, d) ter mikrodlecev iz alginata ali hitozana s kapsuliranimi liposomi z EGCG (e, f).

Figure 17: Representative light microscopy images of the empty alginate or chitosan microparticles (a, b), alginate or chitosan microparticles containing liposomes with (\pm)-catechin (c, d) and alginate or chitosan microparticles containing liposomes with EGCG (e, f).



Slika 18: Slike SEM mikrodelcev iz alginata z vključenimi liposomi pred (a) in po soniciranju (b) ter mikrodelcev iz hitozana z vključenimi liposomi pred (c) in po soniciranju (d).

Figure 18: Representative SEM images of alginate microparticles containing liposomes before (a) and after sonication (b) and of chitosan microparticles containing liposomes before (c) and after sonication (d).

4.2.2 Učinkovitost kapsulacije

Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG v mikrodelce iz hitozana ali alginata je bila v vseh primerih nižja od 1 %, ne glede na uporabljeno koncentracijo polimera (1,5 % (m/m) ali 2,0 % (m/m)) in premreževalnega sredstva (1,5 % (m/v) ali 2 % (m/v)). Zaradi poroznosti polisaharidnih nosilcev ter dobre vodotopnosti kapsuliranih komponent je prišlo do difuzije (\pm)-katehina in EGCG iz mikrodelcev v utrjevalno raztopino že med samim postopkom kapsulacije in utrjevanja mikrodelcev. Učinkovitost kapsulacije v polisaharidne hidrogel je možno povečati na različne načine; npr. s povečanjem velikosti delcev povečamo pot difuzije kapsuliranih molekul v okoljsko raztopino in na ta način upočasnimo izgubljanje kapsuliranih komponent že med samim postopkom kapsulacije (McClements, 2015). Vsebnost kapsulirane komponente v delcih lahko povečamo tako, da komponento dodamo v utrjevalno raztopino in s tem zmanjšamo difuzijo komponente iz kapsul (Belščak-Cvitanović in sod., 2011). Učinkovitost kapsulacije v hidrogel lahko izboljšamo tudi s predhodno kapsulacijo jedrnih snovi v liposome. Slednje možnosti smo se poslužili v nadaljnjem delu in vse sledeče

eksperimente naredili s (\pm)-katehinom in EGCG v liposomih oziroma v mikrodelcih iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi.

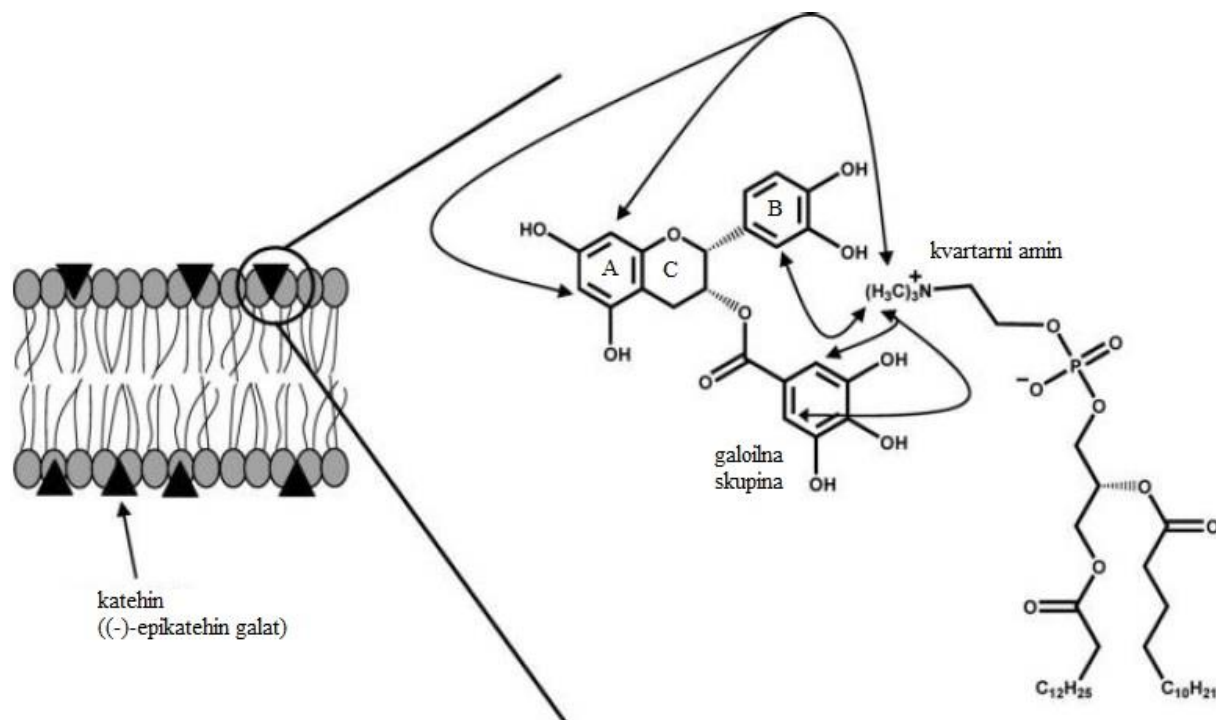
Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG ter vsebnost komponent v posameznih sistemih sta prikazani v preglednici 10. Visoka učinkovitost kapsulacije v liposome je primerljiva z rezultati, ki jih opisujejo Zou in sod. (2014), ki so EGCG kapsulirali v liposome z 92,1 % učinkovitostjo, ter Rashidinejad in sod. (2014), ki so dosegli več kot 70 % učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG v liposome. Po kapsulaciji liposomov s (\pm)-katehinom in EGCG v mikrodelce iz alginata ali hitozana se učinkovitost kapsulacije ni bistveno spremenila, kar pomeni, da so med samim postopkom priprave mikrodelcev liposomi ohranili svojo stabilnost. Višja učinkovitost kapsulacije obeh komponent v mikrodelce iz hitozana z liposomi celo kaže na to, da se je del komponent, ki se niso vgradile v liposome, ujel v hidrogel mikrodelcev. Podoben sistem kapsulacije v mikrodelce opisujejo Lee in sod. (2008), ki so liposome s (\pm)-katehinom kapsulirali v mikrodelce iz kalcijevega pektinata in dosegli do 78 % učinkovitost kapsulacije.

Višja učinkovitost kapsulacije EGCG kot (\pm)-katehina je verjetno posledica različnih interakcij katehinov s fosfolipidnimi membranami. EGCG ima namreč največji vpliv na strukturne lastnosti fosfolipidnih membran v primerjavi s (\pm)-katehinom, (–)-epikatehinom in (–)-epigalokatehinom. Zaradi galoilne skupine lahko EGCG tvori veliko vodikovih vezi, medtem ko ester z galno kislino na mestu C3 EGCG prispeva k bolj nepolarnemu značaju molekule. Te lastnosti omogočajo EGCG tvorbo zelo močnih interakcij z lipidnimi membranami (Abram in sod., 2013).

Interakcije med (–)-epikatehin galatom in fosfolipidnimi membranami so podrobno preučevali tudi Uekusa in sod. (2011), ki so prav tako pokazali, da je pomemben dejavnik, ki odloča o vgrajevanju molekul v fosfolipidni dvosloj, hidrofobnost molekule. Prisotnost galoilne skupine prisostvuje k povečani hidrofobnosti katehinov ter posledično poveča afiniteto katehinov do fosfolipidne membrane. Drug pomemben dejavnik predstavljajo interakcije kation-II obroča B in galoilne skupine katehin galatov s kvartarnim aminom glave fosfolipida. Uekusa in sod. (2011) so namreč pokazali, da se je v liposome z 10 % fosfatidilserina, ki so imeli negativni neto naboj, vezalo znatno manj (–)-epikatehin galata kot v kontrolne liposome iz 100 % fosfatidilholina brez neto naboja. Delež (–)-epikatehin galata, vezanega v liposome z 10 % stearil amina s pozitivnim neto nabojem, je bil primerljiv z deležem (–)-epikatehin galata, vezanega v kontrolne liposome. Iz rezultatov so sklepali, da je prisotnost kationa, kvartarnega amina, bistvenega pomena za tvorbo interakcije med katehini in fosfolipidi.

Poleg visoke afinitete katehin galatov do fosfolipidne membrane je pomembna tudi njihova stabilnost v fosfolipidnih dvoslojih. Raziskave kažejo, da med obročem B in galoilno skupino

katehin galatov prihaja do interakcij Π - Π , ki naj bi dodatno vzpodbudile interakcije kation- Π ter na ta način stabilizirale katehin galate v fosfolipidnih membranah. Model verjetnih interakcije med katehini in fosfolipidnim dvoslojem je prikazan na primeru (-)-epikatehin galata na sliki 19 (Uekusa in sod., 2011; Uekusa in sod., 2007).



Slika 19: Shematski prikaz možnih interakcij (-)-epikatehin galata s fosfolipidnimi dvosloji (Uekusa in sod., 2007).

Figure 19: Schematic representation of the possible interaction between (-)-epicatechin gallate and phospholipid bilayers (Uekusa et al., 2007).

Vsebnost jedrne spojine v liposomih je znašala 8,7 % v primeru (\pm)-katehina in 9,8 % v primeru EGCG. Vrednosti sta višji v primerjavi z vrednostmi, ki jih najdemo v literaturi; npr. Sanna in sod. (2013) so kapsulirali resveratrol v nanodelce iz poli(ϵ -kapro) laktone in mešanice poli(D,L-mlečne-ko-glikolne) kisline in polietilen glikolne kisline ter dosegli vsebnost komponente do največ 3,95 %. Nizke vsebnosti komponent v mikrodelfcih iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi so v skladu s pričakovanji, saj smo pri pripravi mikrodelfcev sprva prvotno suspenzijo liposomov redčili z raztopino alginata oziroma hitozana v razmerju 1:2, poleg tega pa je za mikrodelfce iz hidrogelov značilna visoka vsebnost vode.

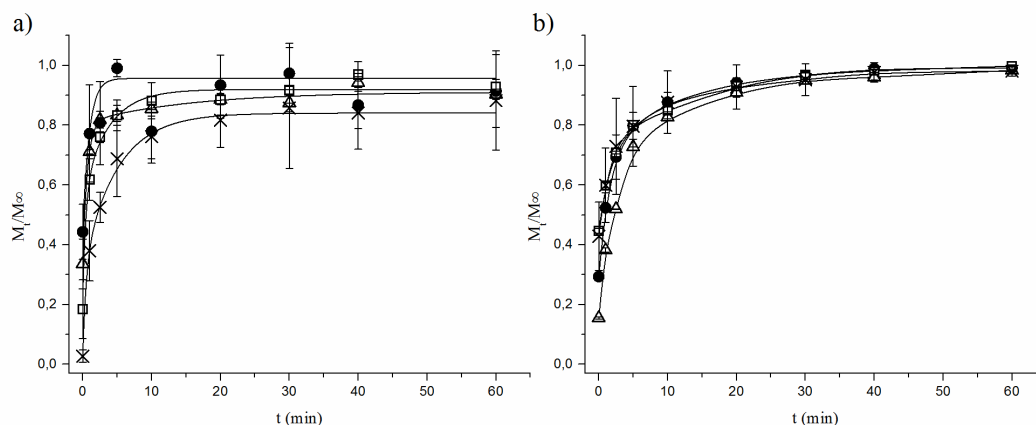
Preglednica 10: Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG ter vsebnost komponent v različnih kapsulacijskih sistemih.

Table 10: Encapsulation efficiency and drug loading of (\pm)-catechin and EGCG for the different encapsulation systems.

Sistem	Učinkovitost kapsulacije (%)		Vsebnost komponente (%)	
	(\pm)-katehin	EGCG	(\pm)-katehin	EGCG
Liposomi	87 (\pm 1)	97,5 (\pm 0,4)	8,7 (\pm 0,1)	9,8 (\pm 0,1)
Mikrodelci iz alginata z liposomi	84 (\pm 1)	97,3 (\pm 0,3)	0,056 (\pm 0,001)	0,065 (\pm 0,001)
Mikrodelci iz hitozana z liposomi	89 (\pm 1)	98,7 (\pm 0,1)	0,059 (\pm 0,001)	0,066 (\pm 0,001)

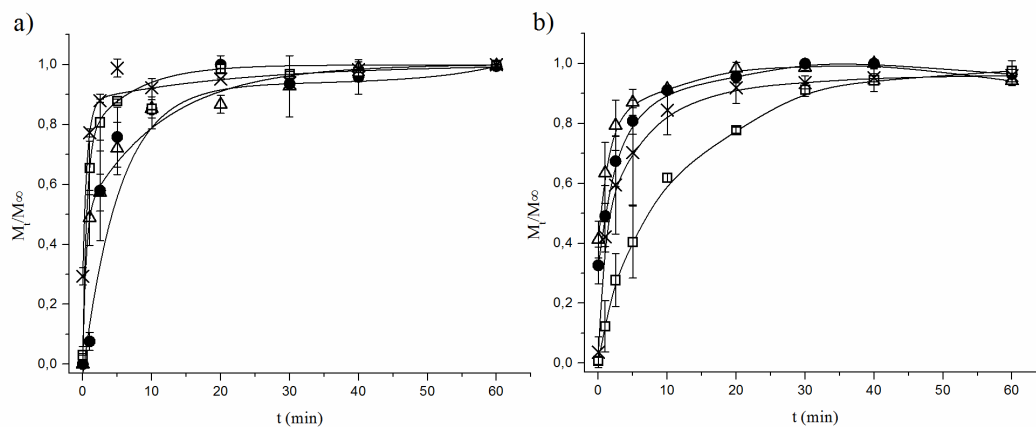
4.2.3 Sproščanje (\pm)-katehina in EGCG iz mikrodelcev

Sproščanja (\pm)-katehina in EGCG iz alginatnih mikrodelcev je prikazano na sliki 20, iz mikrodelcev iz hitozana pa na sliki 21. Testirali smo kombinaciji dveh različnih koncentraciji alginata oziroma hitozana ter dveh različnih koncentracij utrjevalnih raztopin, vendar je bilo v vseh primerih razvidno, da se je po 30 minutah sprostila že večina jedrne komponente. Takšen profil sproščanja je pogost v primeru kapsulacije vodotopnih komponent v polisaharidne nosilce (Sosnik, 2014). V primeru matric tako iz alginata kot iz hitozana kapsulacijski sistemi delujejo kot rezervoarji, ki v kratkih časih sprostijo velik delež kapsuliranih komponent (Blandino in sod., 2000; López-Córdoba in sod., 2014; Li in sod., 2008a).



Slika 20: Sproščanje (\pm)-katehina (a) in EGCG (b) iz alginatnih mikrodelcev v vodi, pri 25 °C. Δ 1,5 % (m/m) alginat in 1,5 % (m/v) CaCl_2 , \bullet 1,5 % (m/m) alginat in 2,0 % (m/v) CaCl_2 , \square 2,0 % (m/m) alginat in 1,5 % (m/v) CaCl_2 , \times 2,0 % (m/m) alginat in 2,0 % (m/v) CaCl_2 . M_t/M_∞ pomeni delež sproščene komponente ob času t.

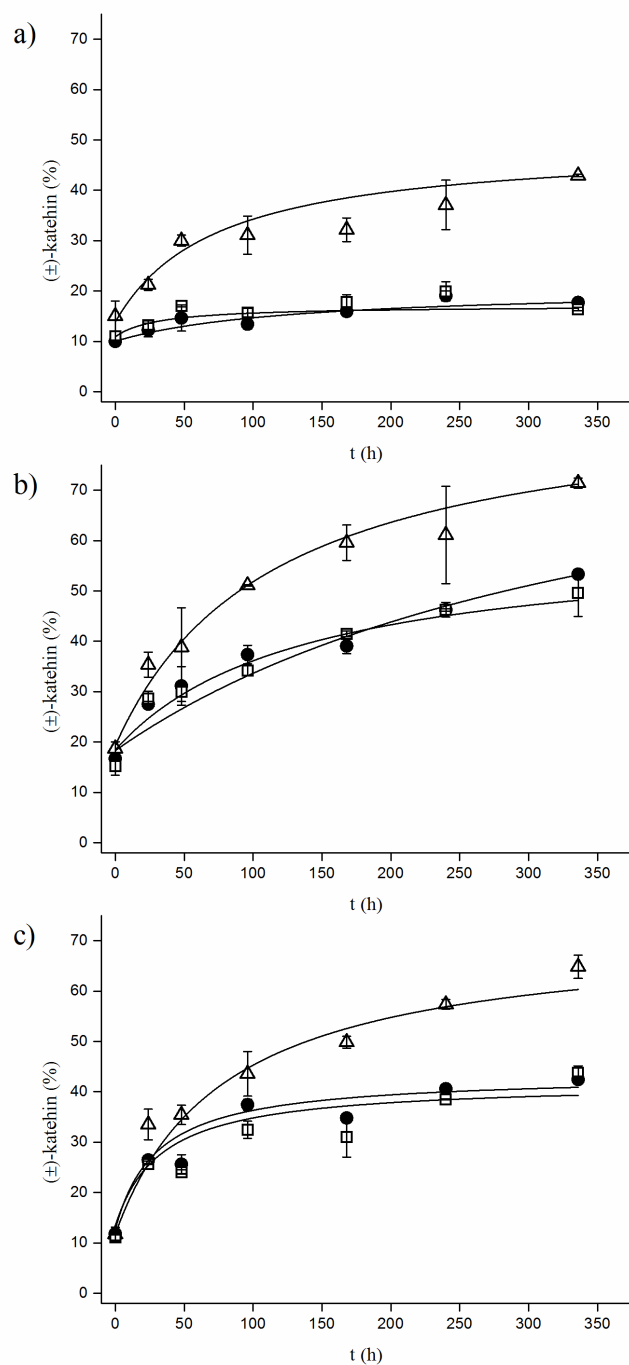
Figure 20: Release of (\pm)-catechin (a) and EGCG (b) from alginate microparticles in water at 25 °C. Δ 1,5% (w/w) alginate and 1,5% (w/v) CaCl_2 , \bullet 1,5% (w/w) alginate and 2,0% (w/v) CaCl_2 , \square 2,0% (w/w) alginate and 1,5% (w/v) CaCl_2 , \times 2,0% (w/w) alginate and 2,0% (w/v) CaCl_2 . M_t/M_∞ is a fraction of compound released at time t.



Slika 21: Sproščanje (\pm)-katehina (a) in EGCG (b) iz mikrodelcev iz hitozana v vodi, pri 25 °C. Δ 1,5 % (m/m) hitozan in 1,5 % (m/v) TPP, \bullet 1,5 % (m/m) hitozan in 2,0 % (m/v) TPP, \square 2,0 % (m/m) hitozan in 1,5 % (m/v) TPP, \times 2,0 % (m/m) hitozan in 2,0 % (m/v) TPP. M_t/M_∞ pomeni delež sproščene komponente ob času t.

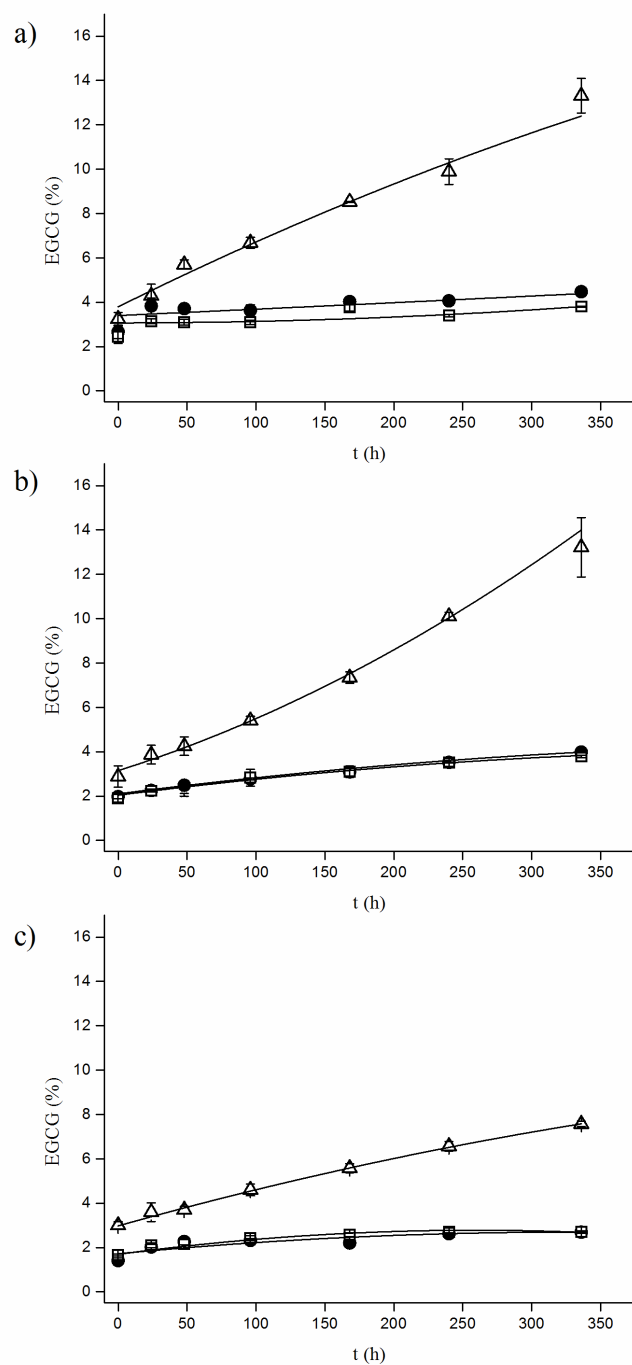
Figure 21: Release of (\pm)-catechin (a) and EGCG (b) from chitosan microparticles in water at 25 °C. Δ 1.5% (w/w) chitosan and 1.5% (w/v) TPP, \bullet 1.5% (w/w) chitosan and 2.0% (w/v) TPP, \square 2.0% (w/w) chitosan and 1.5% (w/v) TPP, \times 2.0% (w/w) chitosan and 2.0% (w/v) TPP at T = 25 °C. M_t/M_∞ is a fraction of compound released at time t.

Sproščanje (\pm)-katehina in EGCG iz liposomov ter iz mikrodelcev iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi je prikazano na slikah 22 in 23.



Slika 22: Sproščanje (±)-katehina iz liposomov (a), iz mikrodelcev iz alginata z vključenimi liposomi (b) in iz mikrodelcev iz hitozana z vključenimi liposomi (c) pri različnih vrednostih pH: Δ pH 2,0; \bullet pH 4,0; \square pH 6,0; pri 25 °C.

Figure 22: Release of (±)-catechin from liposomes (a), from alginate microparticles reinforced with liposomes (b) and from chitosan microparticles reinforced with liposomes (c) according to pH of Δ 2.0, \bullet 4.0 and \square 6.0, at 25 °C.



Slika 23: Sproščanje EGCG iz liposomov (a), iz mikrodelcev iz alginata z vključenimi liposomi (b) in iz mikrodelcev iz hitozana z vključenimi liposomi (c) pri različnih vrednostih pH: Δ pH 2,0; \bullet pH 4,0; \square pH 6,0; pri 25 °C.

Figure 23: Release of EGCG from liposomes (a), from alginate microparticles reinforced with liposomes (b) and from chitosan microparticles reinforced with liposomes (c) according to pH of Δ 2.0, \bullet 4.0 and \square 6.0, at 25 °C.

Iz slike 22 je razvidno, da je bilo sproščanje (\pm)-katehina v primeru vseh kapsulacijskih sistemov najvišje pri pH 2,0, medtem ko pri pH 4,0 in pH 6,0 ni bilo večjih razlik. Delež sproščenega (\pm)-katehina je bil po 14 dneh najnižji v primeru kapsulacije v liposome; pri pH 2,0 se je sprostil 43 % (\pm)-katehina, pri pH 4,0 in pH 6,0 pa 18 % in 16 % (\pm)-katehina. Nadaljnja kapsulacija liposomov s (\pm)-katehinom v mikrodelce iz alginata ali hitozana je povzročila povečano sproščanju (\pm)-katehina. V primeru mikrodelcev iz hitozana smo po 14 dneh določili 65 % sproščenega (\pm)-katehina pri pH 2,0 ter 42 % in 44 % sproščenega (\pm)-katehina pri pH 4,0 in pH 6,0. Največji delež sproščenega (\pm)-katehina smo določili v primeru alginatnih mikrodelcev; 71 % pri pH 2,0 ter 53 % in 50 % pri pH 4,0 in pH 6,0. Lee in sod. (2008), ki so kapsulirali liposome s (\pm)-katehinom v mikrokapsule iz kalcijevega pektinata, prav tako opisujejo pospešeno sproščanje kapsulirane komponente pri nizkem pH v primerjavi z alkalnim pH. Rezultate so pripisali stabilnosti liposomov, ki je večja v nevtralnem območju pH kot v kislem (Connor in sod., 1984).

Delež sproščenega EGCG je bil pri vseh kapsulacijskih sistemih prav tako najvišji pri pH 2,0, medtem ko pri pH 4,0 in pH 6,0 ni bilo večjih razlik v deležu sproščene komponente (slika 23). Med profilom sproščanja EGCG iz liposomov in iz alginatnih mikrodelcev z liposomi ni bilo značilnih razlik; po 14 dneh se je pri pH 2,0 sprostil 13 %, pri pH 4,0 in pH 6,0 pa 4 % EGCG. Sproščanje EGCG iz mikrodelcev iz hitozana z liposomi je bilo rahlo upočasnjeno; po 14 dneh smo pri pH 2,0 določili 8 %, pri pH 4,0 in pH 6,0 pa 3 % sproščenega EGCG.

Sproščanje EGCG iz vseh kapsulacijskih sistemov je bilo upočasnjeno v primerjavi s sproščanjem (\pm)-katehina iz enakih sistemov kapsulacije. Rezultati so posledica različnih interakcij, ki jih imata obe komponenti z lipidnimi membranami. Kot že omenjeno, so Abram in sod. (2013) pokazali, da ima EGCG večji vpliv na strukturo fosfolipidnih membran v primerjavi s (\pm)-katehinom, poleg tega mu amfifilna struktura molekule ter prisotnost galoilne skupine omogočata tvorbo močnih interakcij z lipidnimi membranami. V primeru (\pm)-katehina je nadaljnja vključitev liposomov v mikrodelce povzročila njihovo destabilizacijo in pospešila sproščanje (\pm)-katehina. Do podobnih ugotovitev sta prišla Dhoot in Wheatley (2003), ki sta preučevala sproščanje govejega serumskega albumina iz liposomov, kapsuliranih v alginatne mikrokapsule. Testirala sta različne sestave liposomov (fosfatidilholin, holesterol, fosfatidilglicerol) ter različne premreževalne ione (Ca^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+}). V vseh primerih sta zaznala pospešeno sproščanje govejega serumskega albumina iz kapsuliranih liposomov v primerjavi s prostimi liposomi ter sklepala, da prihaja do vgradnje alginata v lipidni dvosloj, kar sta potrdila z meritvami DSC. Pokazala sta tudi, da so na hitrost sproščanja kapsulirane komponente vplivali premreževalni ioni. Sproščanje proteinov iz liposomov, kapsuliranih v mikrokapsule iz Ca-alginata in Al-alginata je bilo primerljivo s kapsulacijo v alginatne mikrokapsule brez liposomov, medtem ko je bilo sproščanje proteinov iz liposomov v mikrokapsulah iz Ba-alginata upočasnjeno. Ba^{2+} ioni zaradi svoje velikosti

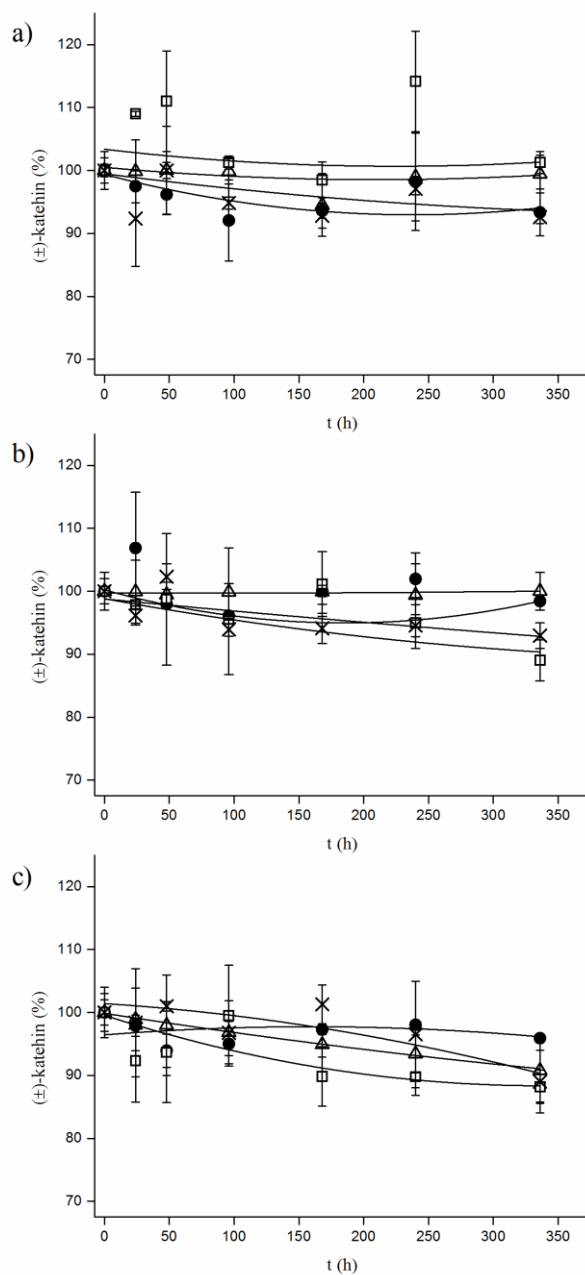
omogočajo gostejše zamreženje alginata ter posledično upočasnjeno difuzijo molekul skozi alginatno mrežo, poleg tega je vezava Ba^{2+} z alginatom hitrejša in močnejša ter tako zmanjša možnosti interakcij prostih verig polisaharida z lipidnimi membranami.

Vpliv alginata na sproščanje kapsulirane komponente iz liposomov so preučevali tudi Takagi in sod. (1996), ki so kapsulirali 5-(6)-karboksifluorescein v liposome iz fosfatidilholina ter iz fosfatidilholina s holesterolom. Liposome so inkubirali v prisotnosti alginata ter ugotovili, da je bilo v prisotnosti višjih koncentracij alginata sproščanje kapsulirane komponente pospešeno, hkrati pa so z gelsko kromatografijo pokazali, da se je kljub temu integriteta membrane liposomov ohranila. V našem primeru je bilo sproščanje (\pm)-katehina pospešeno tudi pri kapsulaciji liposomov v mikrokapsule iz hitozana, iz česar sklepamo, da na podoben način kot alginat tudi hitozan interagira z lipidnimi membranami in vpliva na njihovo prepustnost. V primeru EGCG vključitev liposomov v alginatne mikrodolge ni povzročila pospešenega sproščanja komponente, iz česar sklepamo, da interakcije alginata s fosfolipidnim dvoslojem ne vplivajo na že obstoječe interakcije med fosfolipidnim dvoslojem in EGCG. V primeru kapsulacije liposomov z EGCG v mikrodolge iz hitozana je lahko prišlo do nastanka dodatnih interakcij med EGCG in hitozanom ter posledično še bolj upočasnjena sproščanja EGCG.

4.2.4 Stabilnost prostega in kapsuliranega (\pm)-katehina in EGCG

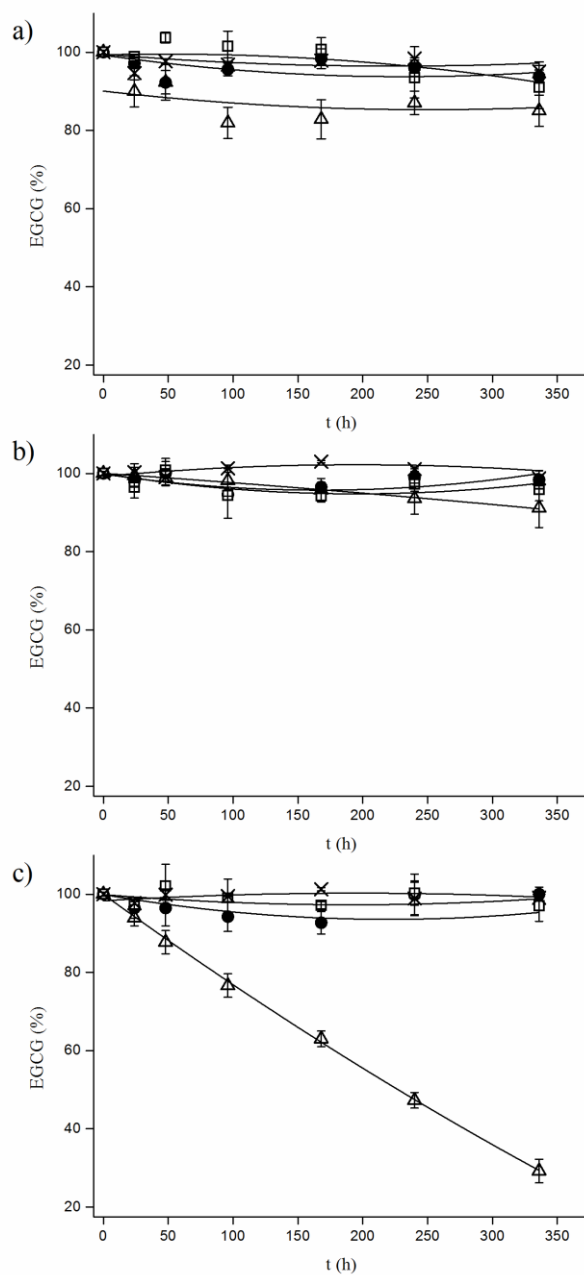
Učinkovitost kapsulacijskih sistemov pri zaščiti (\pm)-katehina in EGCG smo ocenili s preučevanjem stabilnosti prostih in kapsuliranih komponent pri različnih vrednostih pH v odvisnosti od časa. Ugotovili smo, da izbrane vrednosti pH niso imele večjega vpliva na stabilnost tako prostega kot kapsuliranega (\pm)-katehina (slika 24). Iz rezultatov je razvidno, da sam proces kapsulacije ni imel negativnega vpliva na stabilnost (\pm)-katehina, vendar o morebitni zaščitni vlogi kapsulacije zaradi dobre stabilnosti prostega (\pm)-katehina v testiranih območjih pH v danem času ne moremo sklepati.

EGCG je bil najbolj stabilen pri pH 4,0; po 14 dneh inkubacije je prišlo do razgradnje le 9 % EGCG (slika 25). Pri pH 2,0 je v enakem času prišlo do razgradnje 15 % EGCG. Pri pH 6,0 je bila razgradnja najbolj očitna; po 14 dneh inkubacije se je razgradilo 71 % EGCG, kar je razvidno tudi iz primera HPLC kromatograma na sliki 26. Rezultati se ujemajo z ugotovitvami iz literature; Li in sod. (2012) poročajo o največji stabilnosti katehinov v območju pH med 4,0 in 5,2. V območju pH nad 5,2 je z naraščanjem pH prišlo do pospešene razgradnje EGCG, medtem ko je bila razgradnja EGCG v območju pH pod 4,0 prav tako pospešena. V naši raziskavi v primeru kapsuliranega EGCG pri nobeni vrednosti pH nismo zaznali razgradnje. Iz tega sklepamo, da smo s kapsulacijo uspešno zaščitili EGCG pred nizkimi oziroma povišanimi vrednostmi pH.



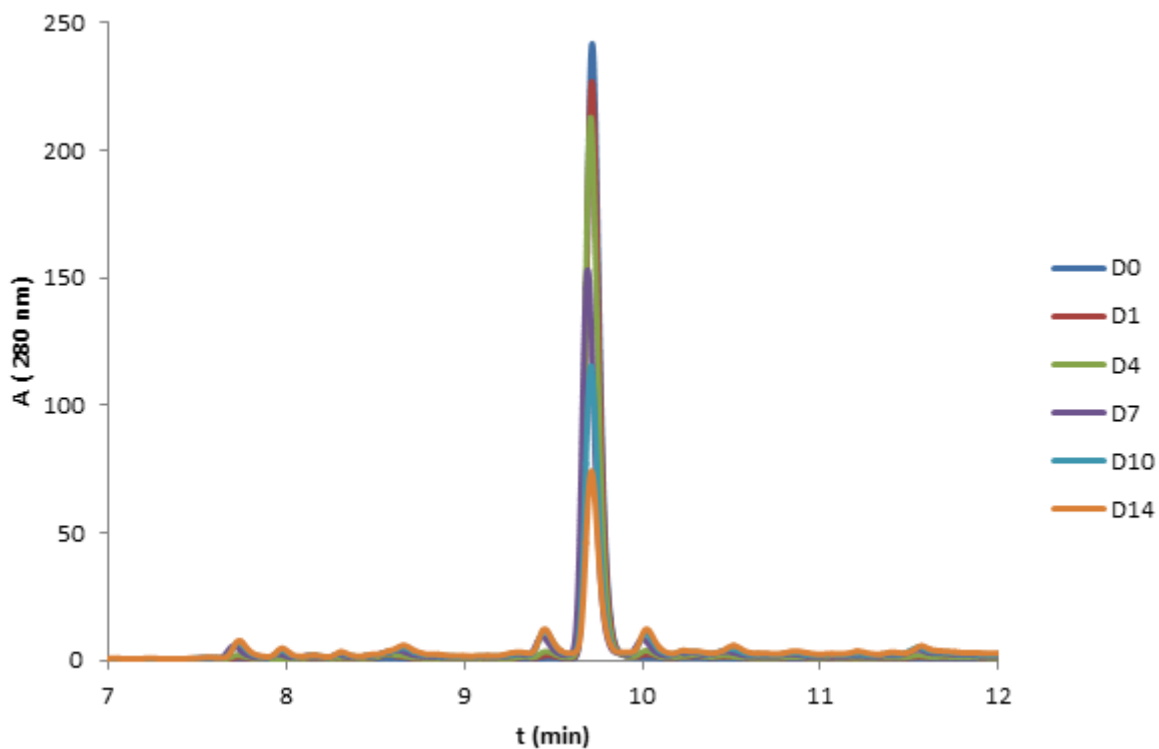
Slika 24: Stabilnost (±)-katehina pri pH 2,0 (a), pH 4,0 (b) in pH 6,0 (c) pri T = 25 °C. Δ prost (±)-katehin, ● (±)-katehin, kapsuliran v liposome, □ (±)-katehin, kapsuliran v liposome in alginatne mikrokapsule, × (±)-katehin, kapsuliran v liposome in mikrokapsule iz hitozana.

Figure 24: Stability of (±)-catechin at pH 2.0 (a), pH 4.0 (b) and pH 6.0 (c) at T = 25 °C. Δ free (±)-catechin, ● (±)-catechin encapsulated in liposomes, □ (±)-catechin encapsulated in liposomes and alginate microcapsules, × (±)-catechin encapsulated in liposomes and chitosan microcapsules.



Slika 25: Stabilnost EGCG pri pH 2,0 (a), pH 4,0 (b) in pH 6,0 (c) pri $T = 25$ °C. Δ prost EGCG, \bullet EGCG, kapsuliran v liposome, \square EGCG, kapsuliran v liposome in alginatne mikrokapsule, \times EGCG, kapsuliran v liposome in mikrokapsule iz hitozana.

Figure 25: Stability of EGCG at pH 2.0 (a), pH 4.0 (b) and pH 6.0 (c) at $T = 25$ °C. Δ free EGCG, \bullet EGCG encapsulated in liposomes, \square EGCG encapsulated in liposomes and alginate microparticles, \times EGCG encapsulated in liposomes and chitosan microparticles.

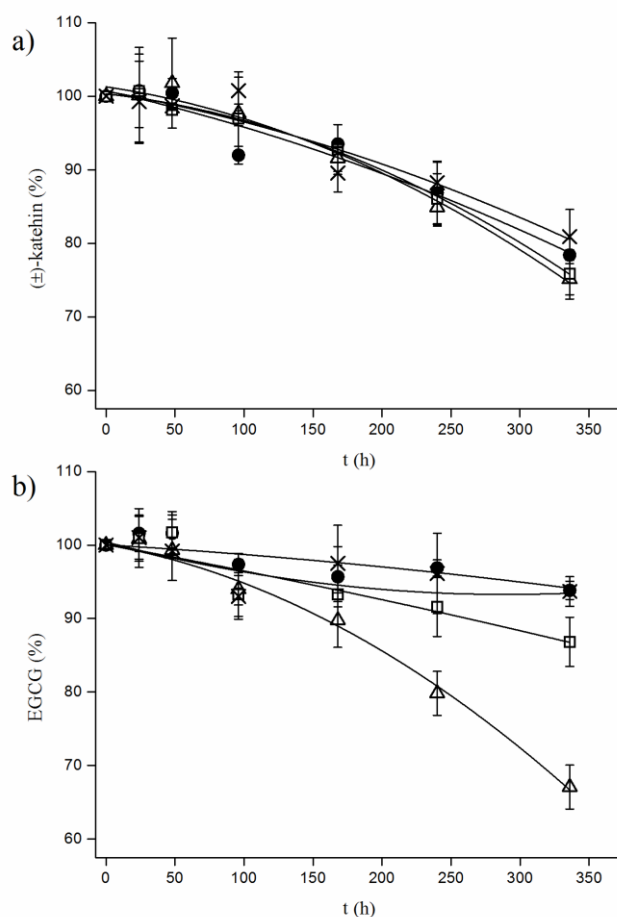


Slika 26: Primer HPLC kromatograma EGCG po različnih časih inkubacije pri pH 6,0. D0 – dan 0, D1 – dan 1, D4 – dan 4, D7 – dan 7, D10 – dan 10, D14 – dan 14.

Figure 26: Representative HPLC chromatogram for EGCG at different times of incubation at pH 6.0. D0 – day 0, D1 – day 1, D4 – day 4, D7 – day 7, D10 – day 10, D14 – day 14.

4.2.5 Stabilnost prostega in kapsuliranega (\pm)-katehina in EGCG v sadnem nektarju

Stabilnost prostega in kapsuliranega (\pm)-katehina in EGCG s časom inkubacije v sadnem nektarju (Fruc - pomaranča, limona; Fructal) kot realnem živilu je prikazana na sliki 27.



Slika 27: Stabilnost (\pm)-katehina (a) in EGCG (b) v sadnem nektarju (pH = 3,4) pri T = 25 °C. Δ prosta komponenta, \bullet kapsulacija v liposome, \square kapsulacija v liposome in alginatne mikrodelce, \times kapsulacija v liposome in mikrokapsule iz hitozana.

Figure 27: Stability of (\pm)-catechin (a) and EGCG (b) in fruit nectar (pH = 3.4) at T = 25 °C. Δ non-encapsulated compound, \bullet encapsulation in liposomes, \square encapsulation in liposomes and alginate microparticles, \times encapsulation in liposomes and chitosan microparticles.

Kljub temu, da je pH nektarja ugoden za stabilnost katehinov (pH = 3,4), smo zaznali razgradnjo tako (\pm)-katehina kot EGCG. V 14 dneh je prišlo do razgradnje 25 % (\pm 3 %) prostega (\pm)-katehina in 33 % (\pm 3 %) prostega EGCG. Na stabilnost katehinov poleg pH vplivajo tudi druge komponente, prisotne v soku, kot so saharoza, citronska kislina ter askorbinska kislina (Chen in sod., 2001). Su in sod. (2003) so preučevali stabilnost katehinov iz zelenega čaja v prisotnosti saharoze ter kombinacije saharoze in citronske oziroma

askorbinske kisline. Ugotovili so, da dodatek saharoze ni vplival na stabilnost katehinov v primerjavi s kontrolo, medtem ko je imel dodatek kombinacije saharoze in citronske oziroma askorbinske kisline negativen vpliv na stabilnost katehinov. Testirali so tudi stabilnost katehinov v komercialno dostopnih gaziranih pijačah, kot so Sprite, 7up (pH 3,23), Pepsi (pH 2,6) in Coca Cola (pH 2,6) ter v vseh primerih zaznali pospešeno razgradnjo katehinov v primerjavi s kontrolo, kjer so katehine inkubirali v destilirani vodi.

Kapsulacija ni doprinesla k boljši stabilnosti (\pm)-katehina medtem ko je v primeru EGCG značilno izboljšala njegovo stabilnost. Po 14 dneh je v primeru kapsulacije v alginatne mikrodolge z liposomi prišlo do razgradnje 13 % (\pm 3 %) EGCG, v primeru kapsulacije v liposome oziroma v mikrodolge iz hitozana z liposomi pa je prišlo do razgradnje le 6 % (\pm 2 %) EGCG. Čeprav pri preučevanju stabilnosti EGCG pri različnih vrednostih pH nismo zaznali razlik med posameznimi kapsulacijskimi sistemi (slika 25), je bila stabilnost EGCG v mikrodolcih iz alginata in liposomov nižja v primerjavi s stabilnostjo v liposomih in v mikrodolcih iz hitozana in liposomov. To si lahko razlagamo z destabilizacijo membran liposomov zaradi interakcij alginata s fosfolipidnimi membranami (Dhoot in Wheatley, 2003). Takšne destabilizirane membrane so lahko bolj občutljive na določene komponente, ki se nahajajo v nektarju, ter tako pospešijo sproščanje in s tem razgradnjo EGCG.

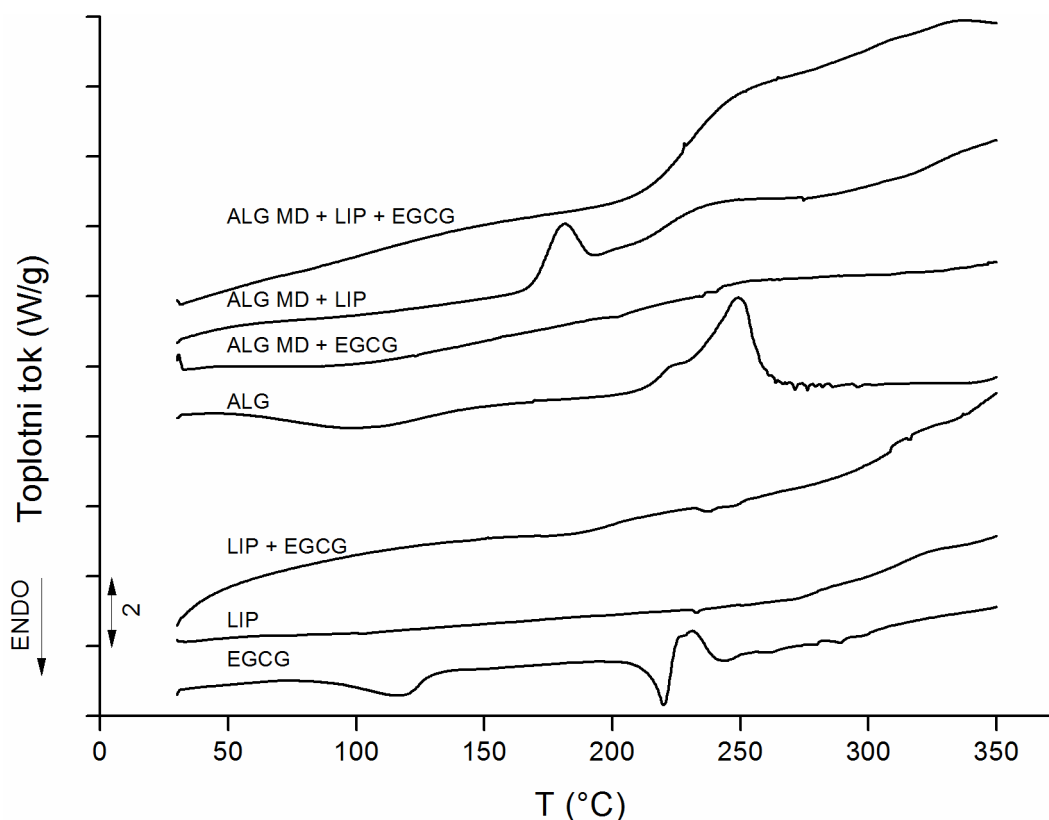
Zaradi hitrejšega sproščanja (\pm)-katehina iz testiranih kapsulacijskih sistemov ter zaradi boljše stabilnosti (\pm)-katehina v primerjavi z EGCG, kapsulacijski sistemi niso imeli zaščitne vloge pri obstojnosti (\pm)-katehina v sadnem nektarju. V nadaljevanju smo se tako osredotočili na kapsulacijo EGCG in njegove interakcije s posameznimi komponentami kapsulacijskih sistemov, kar smo preučili z meritvami DSC in FTIR.

4.2.6 Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in posameznimi komponentami kapsulacijskih sistemov

Značilnost termičnih prehodov posameznih komponent (EGCG, liposomi, alginat in hitozan) ter kapsulacijskih sistemov (liposomi z EGCG, mikrodolci z EGCG, mikrodolci z liposomi ter mikrodolci z liposomi in EGCG) smo preučevali z DSC. Rezultati meritev DSC so predstavljeni kot krivulje toplotnega toka v odvisnosti od temperature (sliki 28 in 29). Krivulja DSC čistega EGCG kaže endotermni vrh pri 220 °C, ki ustreza temperaturi taljenja EGCG (Ramkumar in sod., 2015). Eksotermni vrh, ki sledi endotermnemu, verjetno kaže na termično razgradnjo EGCG. Pri temperaturah nad 180 °C se krivulja DSC liposomov počasi obrača v eksotermno smer, kar sovпада z razgradnjo lecitina. Med krivuljami liposomov in liposomov s kapsuliranim EGCG ni bilo večjih razlik. Vrh, ki ustreza taljenju EGCG, je bil na krivulji liposomov z EGCG odsoten, kar kaže na odsotnost kristalne oblike EGCG. Sklepamo, da je bil EGCG ujet v liposomih v obliki trdne amorfne snovi. Podobne rezultate opisujejo Isailović in sod. (2013), ki so v liposome kapsulirali resveratrol.

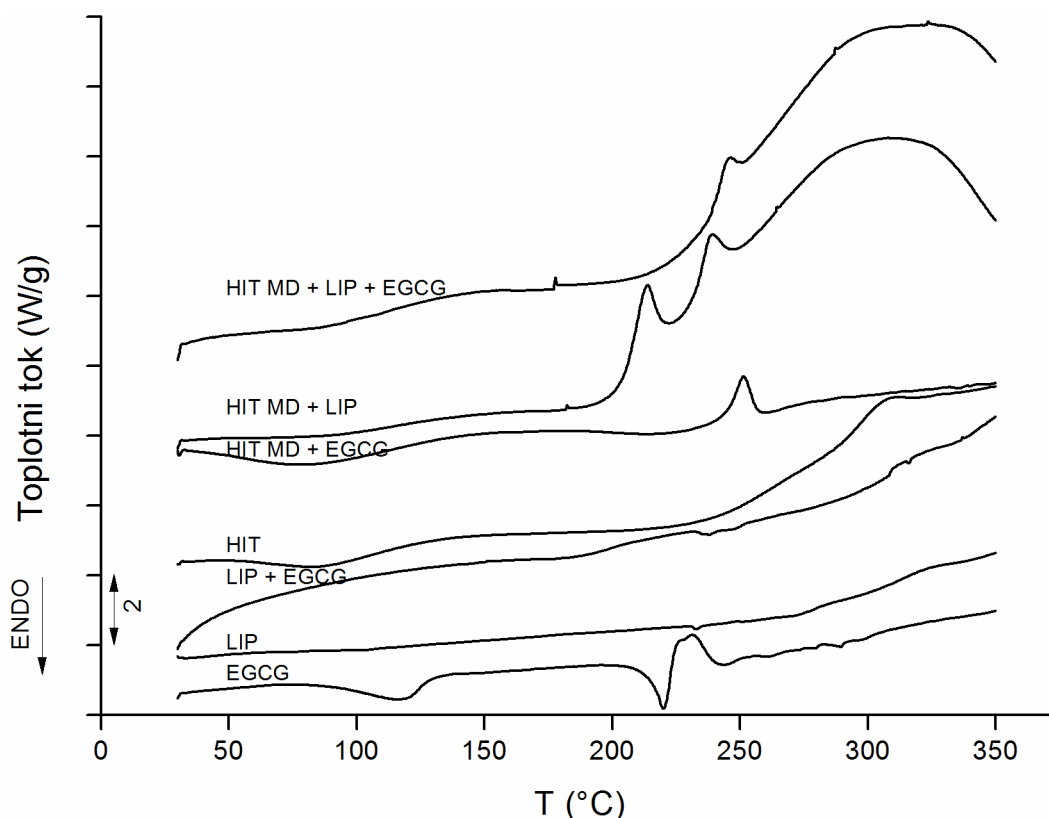
Na krivulji DSC alginata je v temperaturnem območju med 210 °C in 265 °C prisotnih več zaporednih vrhov, ki kažejo na razgradnjo alginata (González-Rodríguez in sod., 2002). Na krivulji alginatnih mikrodelcev z EGCG so v temperaturnem območju okrog 200 °C prav tako prisotni vrhovi, ki ustrezajo razgradnji alginata, medtem ko vrh taljenja EGCG ni razviden. V tem primeru je to bolj verjetno posledica zelo nizke učinkovitosti kapsulacije EGCG (<1 %), kot pa učinkovite vgradnje EGCG v alginatne mikrodelce. Krivulja alginatnih mikrodelcev z vgrajenimi praznimi liposomi kaže eksotermen vrh pri 181 °C, ki je lahko posledica interakcij med liposomi in alginatom. Odsotnost omenjenega vrha ter hkrati odsotnost vrha pri temperaturi taljenja EGCG na krivulji alginatnih mikrodelcev z liposomi s kapsuliranim EGCG, kaže, da je bil EGCG vgrajen v liposome, medtem ko so bili liposomi ujeti v notranjosti alginatne matrice.

Krivulja DSC hitozana kaže širok eksotermni vrh z začetkom pri 240 °C in vrhom pri okrog 290 °C, kar sovpada z razgradnjo hitozana (Ramkumar in sod., 2015). Krivulja mikrodelcev iz hitozana z EGCG kaže eksotermni vrh pri 251 °C, ki ga lahko pripišemo ionskim interakcijam med hitozanom in TPP (Gierszewska-Drużyńska in Ostrowska-Czubenko, 2010). Omenjeni vrh lahko opazimo tudi pri 239 °C oziroma pri 246 °C na krivuljah mikrodelcev iz hitozana z liposomi oziroma mikrodelcev iz hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG. Na krivulji mikrodelcev iz hitozana s praznimi liposomi je prisoten dodaten eksotermni vrh pri 214 °C, ki lahko kaže na interakcije med liposomi in hitozanom. Ta vrh, kot tudi vrh, ki ustreza temperaturi taljenja EGCG, sta bila odsotna na krivulji mikrodelcev iz hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG. Podobno kot v primeru alginatnih mikrodelcev tudi tukaj lahko sklepamo, da je EGCG učinkovito vgrajen v liposome, medtem ko liposomi ostajajo ujeti v matrici iz hitozana.



Slika 28: Krivulje DSC EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), alginata (ALG), alginatnih mikrodelcev z EGCG (ALG MD + EGCG), alginatnih mikrodelcev z liposomi (ALG MD + LIP) ter alginatnih mikrodelcev z liposomi s kapsuliranim EGCG (ALG MD + LIP + EGCG).

Figure 28: DSC curves of EGCG, liposomes (LIP), liposomes with encapsulated EGCG (LIP + EGCG), alginate (ALG), alginate microparticles with EGCG (ALG MD + EGCG), alginate microparticles containing liposomes (ALG MD + LIP) and alginate microparticles containing liposomes with EGCG (ALG MD + LIP + EGCG).



Slika 29: Krivulje DSC EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), hitozana (HIT), mikrodelcev iz hitozana z EGCG (HIT MD + EGCG), mikrodelcev iz hitozana z liposomi (HIT MD + LIP) ter mikrodelcev iz hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG (HIT MD + LIP + EGCG).

Figure 29: DSC curves of EGCG, liposomes (LIP), liposomes with encapsulated EGCG (LIP + EGCG), chitosan (HIT), chitosan microparticles with EGCG (HIT MD + EGCG), chitosan microparticles containing liposomes (HIT MD + LIP) and chitosan microparticles containing liposomes with EGCG (HIT MD + LIP + EGCG).

Interakcije med EGCG in posameznimi komponentami kapsulacijskih sistemov smo preučevali z meritvami FTIR. Spektri FTIR osnovnih materialov, liposomov z EGCG ter mikrodelcev iz alginata ali hitozana z liposomi in EGCG so prikazani na slikah 30 in 31. Spektri osnovnih materialov se skladajo s spektri iz literature. Spektar EGCG kaže značilne vrhove pri naslednjih valovnih številih: 828, 1041, 1146, 1219, 1344, 1447, 1518, 1616 in 1690 cm^{-1} in jih pripisujemo skupinam C-H alkenov, -C-O alkoholov, C-OH alkoholov, -OH aromatskih spojin, C-O alkanov, C=C aromatskega obroča, C=C alkenov in vzdolžnemu nihanju karbonilne skupine galne kisline (Tang in sod., 2013; Zou in sod., 2014). Spektar FTIR liposomov kaže manjše vrhove pri 2923, 2853 in 3353 cm^{-1} , ki se nahajajo na večjem vrhu, ki se razteza od 2800 do 3500 cm^{-1} in kaže na vzdolžno nihanje O-H. Razširitev vrha kaže na tvorbo vodikovih vezi. Majhna vrhova pri 2923 in 2853 cm^{-1} kažeta na asimetrično in simetrično raztezanje acilnih verig CH_2 , medtem ko vrh pri 3353 cm^{-1} kaže na nihanje OH vezi fenolnih ali hidroksilnih skupin (Tang in sod., 2013). Vrh pri 1465 cm^{-1} ustreza strižnemu nihanju skupin CH_2 , vrh pri 1690 cm^{-1} pa vzdolžnemu nihanju karbonilne skupine.

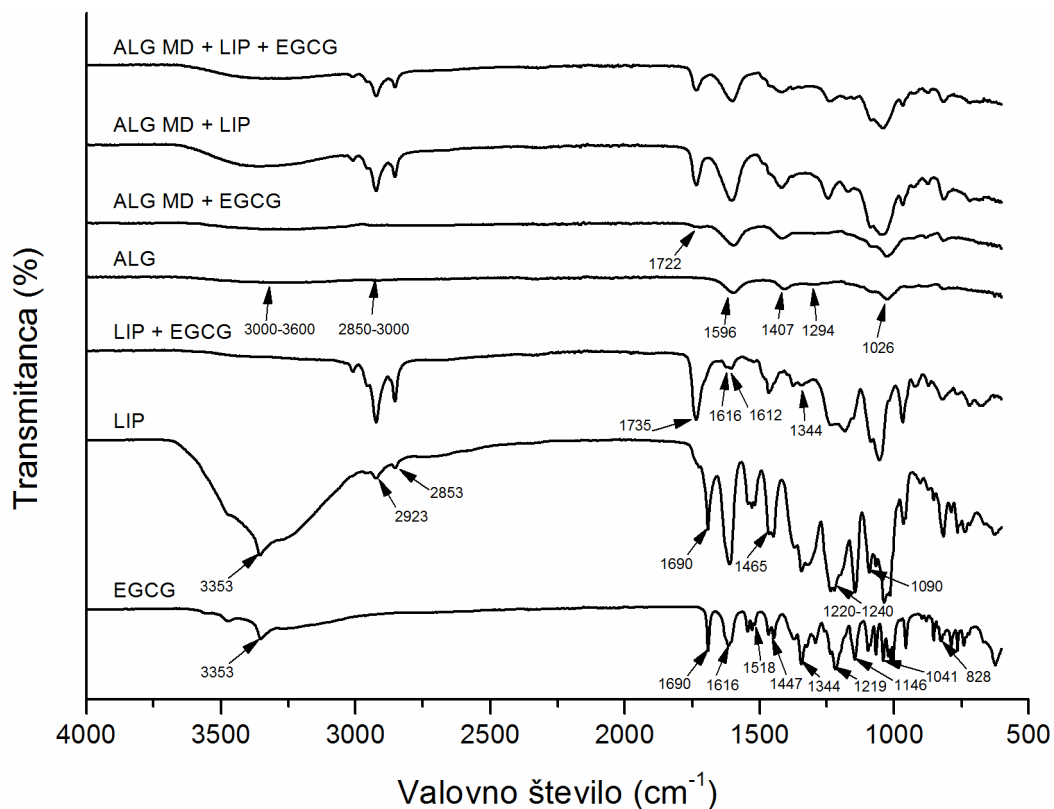
Vrhova pri 1090 cm^{-1} in pri $1220\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$ ustrezata simetričnemu in antisimetričnemu vzdolžnemu nihanju skupine PO_2^- (Mady in Eishemey, 2011).

Na spektru liposomov s kapsuliranim EGCG so prisotni vrhovi pri 1344 cm^{-1} in 1616 cm^{-1} , značilni za EGCG, kar potrjuje njegovo prisotnost. Oster vrh na spektru praznih liposomov pri 1612 cm^{-1} se je na spektru liposomov z EGCG pojavil kot dvojni vrh, verjetno zaradi prekrivanja z vrhovi v tej regiji, ki so značilni za EGCG. Vrh pri 3353 cm^{-1} , ki je prisoten tako na spektru EGCG kot tudi na spektru praznih liposomov, je bil na spektru liposomov s kapsuliranim EGCG odsoten. Vrh pri 1690 cm^{-1} , ki je prav tako prisoten na spektrih EGCG in praznih liposomov, je na spektru liposomov s kapsuliranim EGCG spremenil svojo pozicijo na 1735 cm^{-1} . Omenjene spremembe v spektru liposomov s kapsuliranim EGCG v primerjavi s spektri posameznih komponent potrjujejo prisotnost interakcij med EGCG in liposomi.

Spekter FTIR alginata kaže vrhova pri 1596 in 1407 cm^{-1} , ki ustrezata antisimetričnemu in simetričnemu nihanju skupine CO_2^- . Vrh pri 1294 cm^{-1} ustreza nihanju skeleta, vrh pri 1026 cm^{-1} pa ustreza antisimetričnemu vzdolžnemu nihanju C-O-C in ga pripisujemo saharidnim strukturam. Spekter hitozana prav tako kaže več karakterističnih vrhov. Širok vrh pri 3341 cm^{-1} ter vrh pri 2865 cm^{-1} ustrezata vzdolžnemu nihanju skupin O-H in C-H. Vrh pri 1648 cm^{-1} ustreza vzdolžnemu nihanju C=O amida, vrh pri 1589 cm^{-1} pa ustreza prečnemu nihanju N-H amina in amida II. Vrh pri 1376 cm^{-1} ustreza simetrični deformaciji CH_3 , vrh pri 1152 cm^{-1} ustreza antisimetričnemu vzdolžnemu nihanju C-O-C in nihanju C-N, vrh pri 1025 cm^{-1} pa ustreza vzdolžnemu nihanju C-O (Lawrie in sod., 2007; Li in sod., 2008b; Luo in sod., 2010).

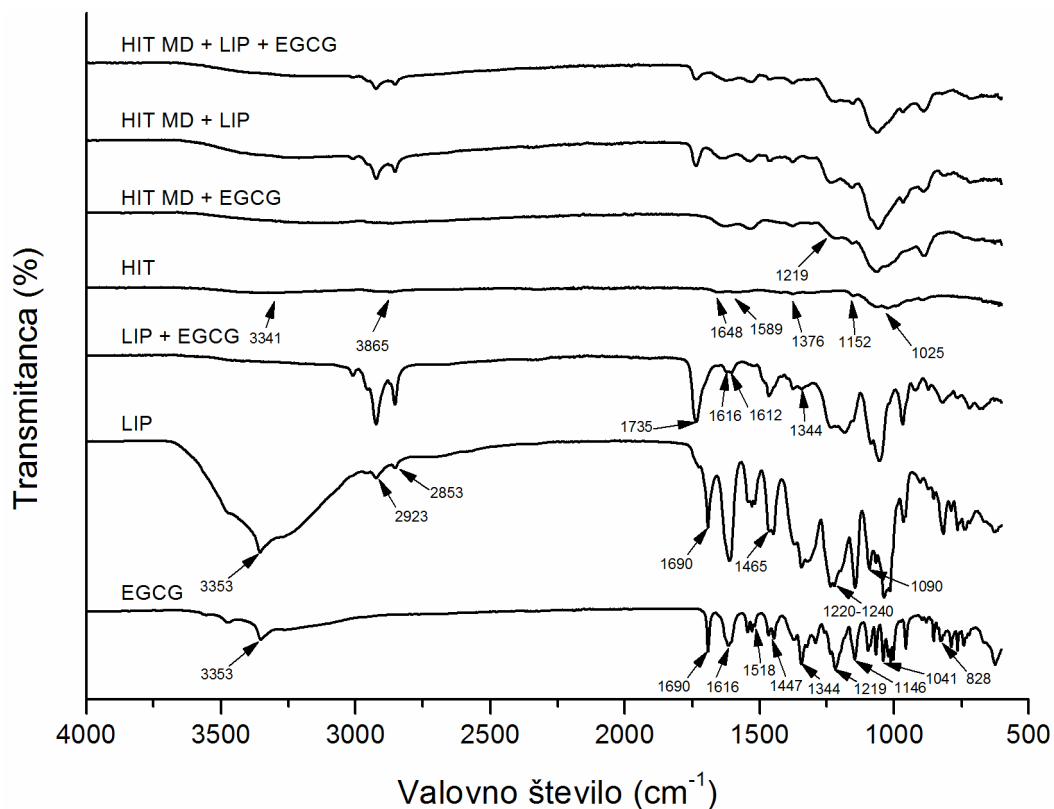
Spektra mikrodelcev iz alginata oziroma hitozana s kapsuliranim EGCG kažeta enake vrhove, kot so značilni za čist alginat oziroma hitozan. Na spektru mikrodelcev iz alginata z EGCG smo zaznali nov vrh pri 1722 cm^{-1} , na spektru mikrodelcev iz hitozana z EGCG pa smo zaznali prisotnost vrha pri 1219 cm^{-1} , ki je značilen za EGCG. Ti rezultati nakazujejo, da je EGCG možno zaznati, čeprav je prisoten le v zelo nizkih koncentracijah, saj je bila učinkovitost kapsulacije v obeh primerih nižja od 1 %.

Vrhovi spektrov alginatnih mikrodelcev s praznimi liposomi ter vrhovi spektrov alginatnih mikrodelcev z liposomi z EGCG so bili identični. Prav tako nismo zaznali razlik med spektroma mikrodelcev iz hitozana s praznimi liposomi ter mikrodelcev iz hitozana z liposomi z EGCG. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da EGCG ostaja dobro vgrajen v liposomih tudi po kapsulaciji liposomov v mikrodelcev iz alginata oziroma hitozana. Glavne interakcije se dogajajo med EGCG in liposomi, medtem ko med EGCG in alginatom oziroma hitozanom ne prihaja do signifikantnih interakcij.



Slika 30: Spektri FTIR EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), alginata (ALG), alginatnih mikrodlecev z EGCG (ALG MD + EGCG), alginatnih mikrodlecev z liposomi (ALG MD + LIP) ter alginatnih mikrodlecev z liposomi s kapsuliranim EGCG (ALG MD + LIP + EGCG).

Figure 30: FTIR spectra of EGCG, liposomes (LIP), liposomes with encapsulated EGCG (LIP + EGCG), alginate (ALG), alginate microparticles with EGCG (ALG MD + EGCG), alginate microparticles containing liposomes (ALG MD + LIP) and alginate microparticles containing liposomes with EGCG (ALG MD + LIP + EGCG).



Slika 31: Spektri FTIR EGCG, liposomov (LIP), liposomov s kapsuliranim EGCG (LIP + EGCG), hitozana (HIT), mikrodelcev iz hitozana s kapsuliranim EGCG (HIT MD + EGCG), mikrodelcev iz hitozana z liposomi (HIT MD + LIP) ter mikrodelcev iz hitozana z liposomi s kapsuliranim EGCG (HIT MD + LIP + EGCG).

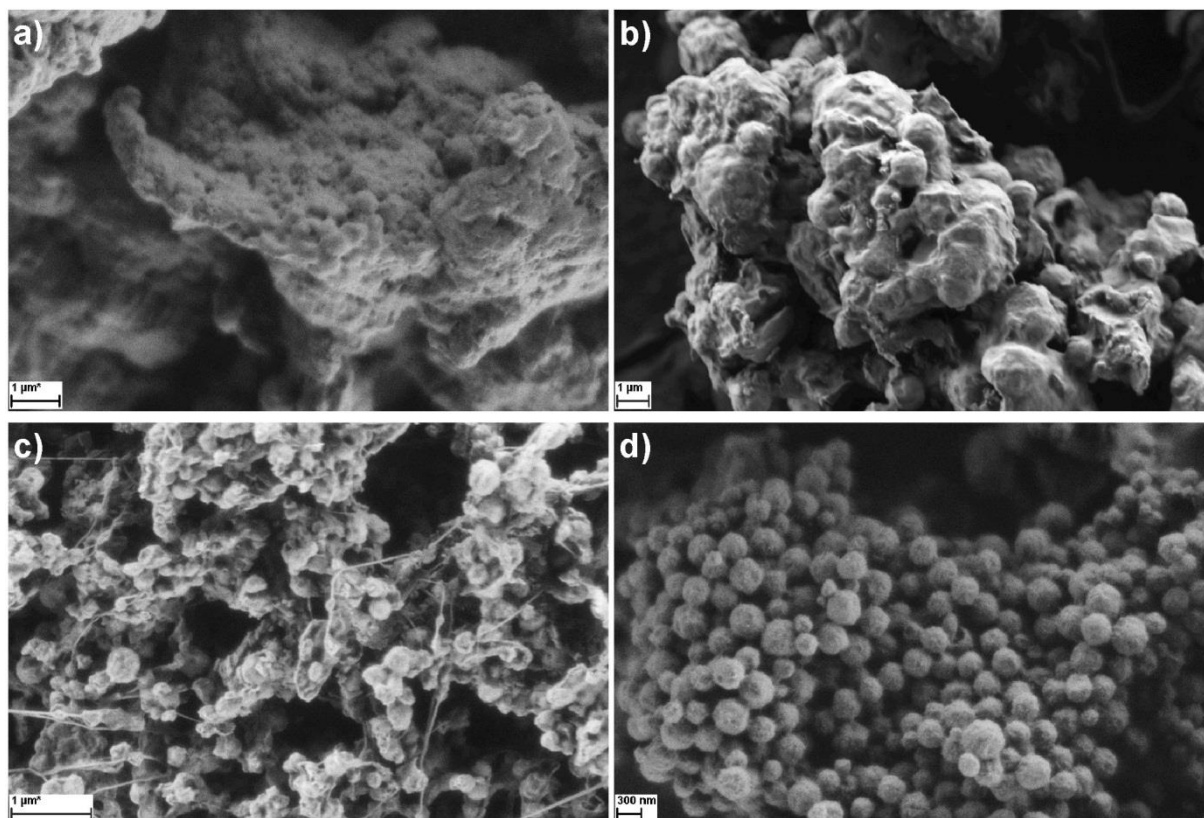
Figure 31: FTIR spectra of EGCG liposomes (LIP), liposomes with encapsulated EGCG (LIP + EGCG), chitosan (HIT), chitosan microparticles with EGCG (HIT MD + EGCG), chitosan microparticles containing liposomes (HIT MD + LIP) and chitosan microparticles containing liposomes with EGCG (HIT MD + LIP + EGCG).

4.3 PRIPRAVA ALGINATNIH SUBMIKRONSKIH DELCEV IN KAPSULACIJA EGCG

Polisaharidni delci, pripravljene z mikrokapsulatorjem, so običajno večji od 100 μm . Z namenom izdelave manjših delcev, ki bi bili iz senzoričnega vidika bolj primerni za rabo v živilih, smo v tretjem delu doktorske naloge optimizirali pripravo alginatnih submikronskih delcev z metodo emulzifikacije in premreževanja notranje faze (Paques in sod., 2012). Rastopino alginata smo emulgirali v olju ter nato alginatne kapljice premrežili z nanodelci CaCl_2 . Uspešnost priprave submikronskih delcev smo spremljali s SEM. V alginatne submikronske delce smo kapsulirali EGCG in delce okarakterizirali glede na učinkovitost kapsulacije in sproščanje EGCG. Interakcije med EGCG in alginatnimi delci smo preučevali z DSC in FTIR.

4.3.1 Priprava in morfologija alginatnih submikronskih delcev

Za pripravo alginatnih submikronskih delcev smo testirali dve različni koncentraciji alginata (1 % in 2 % (m/m) alginat) ter dve različni razmerji emulzij kalcijevih nanodelcev v olju in alginata v olju (2:1 in 3:1). Na podlagi opazovanj med samim postopkom priprave alginatnih delcev ter na podlagi slik SEM smo ugotovili, da smo alginatne submikronske delce uspešno pripravili le v primeru, ko smo uporabili 2 % (m/m) rastopino alginata ter razmerje emulzij kalcijevih nanodelcev v olju in alginatne raztopine v olju 2:1. Med samim postopkom priprave smo namreč opazili, da je bilo v primeru omenjene formulacije možno delce resuspendirati v vodi tudi po odstranitvi oljne faze z emulgatorjem, kar je potrjevalo, da so bili delci v geliranem stanju. V nasprotnem primeru bi se kapljice alginata med postopkom spiranja med seboj združile, kot se je to zgodilo pri ostalih formulacijah. Opažanja so potrdile tudi slike SEM (slika 32); delci pravih sferičnih oblik so bili prisotni le v primeru uspešne formulacije (slika 32d), medtem ko so bili pri ostalih formulacijah v vzorcih prisotni agregati in delci nepravilnih oblik. Delcev kristalnih oblik, ki bi kazali na prisotnost nanodelcev CaCl_2 (Paques in sod., 2012), na slikah SEM nismo zaznali, kar pomeni, da so se kalcijevi nanodelci uspešno raztopili v alginatnih kapljicah ali pa smo preostanek nanodelcev odstranili med postopkom centrifugiranja in spiranja delcev.

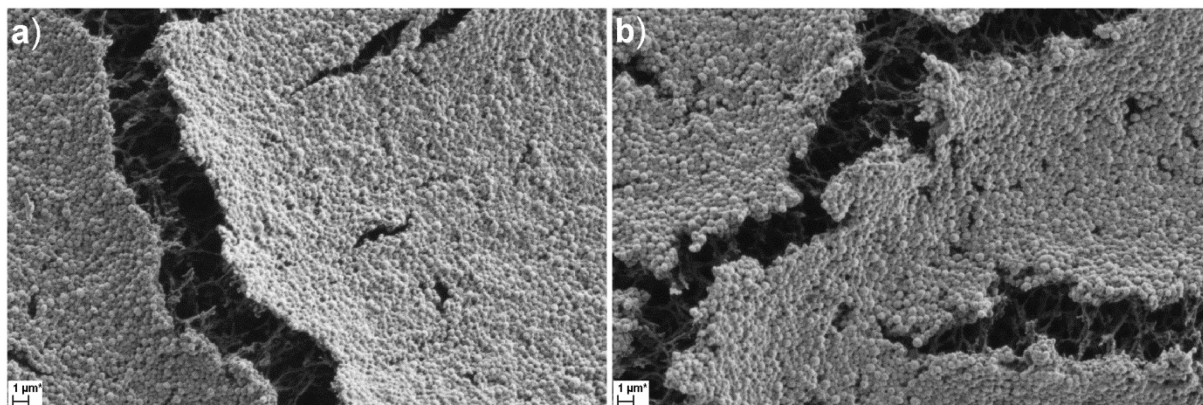


Slika 32: Slike SEM liofiliziranih alginatnih delcev, pripravljanih z različnimi formulacijami: 1 % (m/m) alginat, razmerje emulzij nanodelcev CaCl_2 v olju in alginata v olju je 3:1 (a), 1 % (m/m) alginat, razmerje emulzij nanodelcev CaCl_2 v olju in alginata v olju je 2:1 (b), 2 % (m/m) alginat, razmerje emulzij nanodelcev CaCl_2 v olju in alginata v olju je 3:1 (c), 2 % (m/m) alginat, razmerje emulzij nanodelcev CaCl_2 v olju in alginata v olju je 2:1 (d).

Figure 32: Representative SEM images of lyophilized alginate submicron particles prepared from different formulations: 1% (w/w) alginate, CaCl_2 -in-oil and alginate-in-oil weight ratio 3:1 (a), 1% (w/w) alginate, CaCl_2 -in-oil and alginate-in-oil weight ratio 2:1 (b), 2% (w/w) alginate, CaCl_2 -in-oil and alginate-in-oil weight ratio 3:1 (c) and 2% (w/w) alginate, CaCl_2 -in-oil and alginate-in-oil weight ratio 2:1 (d).

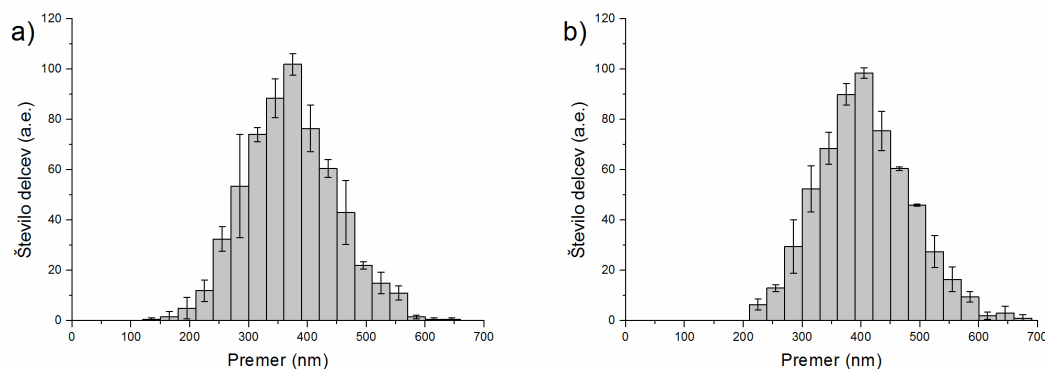
Na sliki 33 sta prikazani sliki SEM na zraku posušenih praznih alginatnih delcev (slika 33a) in alginatnih delcev s kapsuliranim EGCG (slika 33b). Velikost praznih alginatnih delcev je bila od 120 do 660 nm, s povprečjem 370 (\pm 25) nm, medtem ko je bila velikost alginatnih delcev s kapsuliranim EGCG od 210 do 690 nm, s povprečjem 410 (\pm 23) nm (slika 34). Iz rezultatov sklepamo, da kapsulacija EGCG ni imela večjega vpliva na velikost alginatnih delcev, kot smo to opazili pri kapsulaciji resveratrola, kjer je bila povprečna velikost delcev z resveratrolom več kot 100 nm manjša od povprečne velikosti praznih alginatnih delcev (Istenič in sod., 2015). V tem primeru smo sklepali, da je resveratrol kot amfifilna molekula (vsebuje dva aromatska obroča kot hidrofobni del ter tri hidrofilne hidroksilne skupine) deloval kot površinsko aktivna komponenta v kombinaciji s PGPR, ki smo ga uporabili kot emulgator, ter na ta način omogočal nastanek manjših kapljic v alginatni emulziji. Paques in sod. (2013) so z enako metodo pripravile delce, velike okrog 1 μm . Razlike v velikosti delcev

so lahko posledica različnih hitrosti homogenizacije, ki smo jih uporabljali za pripravo emulzije alginata v olju; v našem primeru je bila hitrost homogenizacije 11000 obr./min, medtem ko Paques in sod. (2013) navajajo hitrosti od 5000 do 10000 obr./min. Poleg tega so Paques in sod. (2013) pri spiranju delcev uporabili nižjo centrifugalno silo (od 500 do 1000 g) kot v našem primeru (13000 g), kar ima lahko za posledico izgubo manjših alginatnih delcev.



Slika 33: Sliki SEM na zraku posušenih praznih alginatnih delcev (a) in alginatnih delcev s kapsuliranim EGCG (b) na membranskem filtru.

Figure 33: SEM images of air-dried empty alginate submicron particles (a) and air-dried EGCG loaded alginate submicron particles (b) on membrane filter.



Slika 34: Porazdelitev velikosti praznih alginatnih delcev (a) in alginatnih delcev s kapsuliranim EGCG (b).

Figure 34: Size distribution of empty alginate submicron particles (a) and EGCG loaded alginate submicron particles (b).

Iz slik SEM (sliki 32 in 33) je razvidno, da so alginatni delci ohranili pravilno sferično obliko tako po liofilizaciji (slika 32d) kot po sušenju na zraku (slika 33), kar predstavlja enega od pomembnejših rezultatov te raziskave. Alginatni delci, pripravljani z metodo zunanjega geliranja, se namreč med različnimi postopki sušenja na zraku (na sobni temperaturi ali v pečici) navadno sesedejo vase ali razpokajo (Stojanović in sod., 2012) ali pa med postopkom liofilizacije izgubijo svojo sferično obliko, kot poročajo Cho in sod. (2014). Metoda

eksternega geliranja za pripravo alginatnih delcev pogosto temelji na principu kapljanja raztopine alginata v utrjevalno raztopino CaCl_2 . Ca^{2+} ioni pri tem najprej pridejo v stik s površino alginatne kapljice, kjer pride do takojšnjega zamreženja. Zamrežena površina in povišana lokalna koncentracija Ca^{2+} ionov otežujeta nadaljnjo difuzijo Ca^{2+} ionov v notranjost alginatnega delca, kar ima za posledico nastanek nehomogene strukture mikrodolcev s slabše zamreženo notranjostjo v primerjavi z bolj zamreženo površino. Nasprotno je pri metodi emulzifikacije potreben daljši čas premreževanja, da zagotovimo zadostno adsorpcijo in difuzijo nanodelcev CaCl_2 v notranjost alginatnih kapljic. Postopno premreževanje tako omogoča homogeno porazdelitev Ca^{2+} ionov v notranjosti kapljice ter posledično nastanek homogene strukture alginatnih submikronskih delcev. Homogena struktura delcev omogoča enakomerno krčenje matrice med sušenjem ter posledično gladko površino in ohranitev sferične strukture alginatnih submikronskih delcev (Paques in sod., 2014b; Chan in sod., 2006).

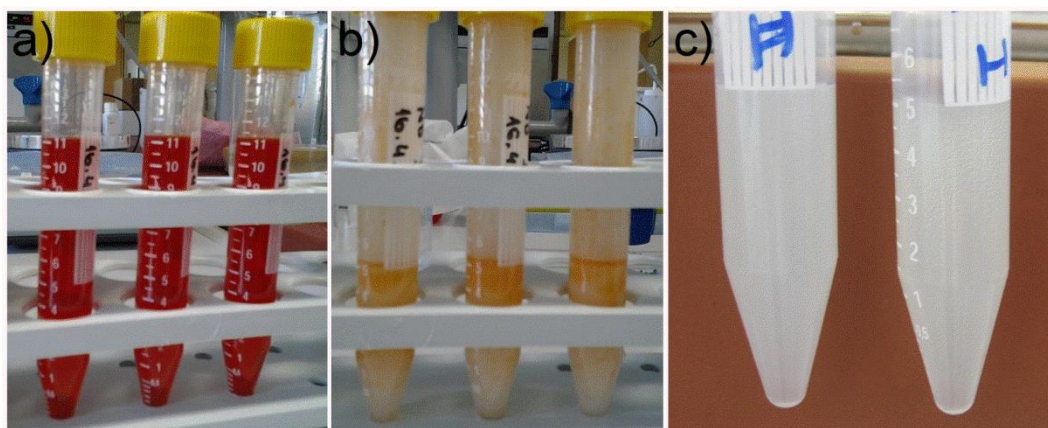
4.3.2 Ločevanje alginatnih submikronskih delcev od oljne faze

Alginatne submikronske delce smo poskusili ločiti iz oljne faze s pomočjo spiranja z različnimi koncentracijami etanola in z destilirano vodo ter na ta način skušali zmanjšati rabo organskih topil. Za lažjo vizualno oceno učinkovitosti odstranjevanja oljne faze smo olje pred pripravo delcev obarvali z oranžnim barvilom Sudan II (slika 35). Pri spiranju delcev z etanolnimi raztopinami po centrifugiranju ni prišlo do izrazite ločbe delcev iz oljne faze, ki je ostala dispergirana po celotnem volumnu supernatanta. V primeru spiranja delcev z destilirano vodo je bila ločba bolj učinkovita, saj so se ostanki olja po centrifugiranju zbrali na površini supernatanta, medtem ko so bili delci zbrani v peletu (slika 36). Po vsakem koraku spiranja smo supernatant odstranili ter delce resuspendirali v sveži destilirani vodi. Po tretjem spiranju v vzorcih nismo več zaznali oranžne barve, iz česar smo sklepali, da smo oljne ostanke učinkovito odstranili. Izmed testiranih topil je bila pri spiranju delcev tako najbolj učinkovita destilirana voda. Poleg toksičnim organskim topilom, ki se običajno uporabljajo pri ločevanju delcev iz oljne faze (acetona, heksana), smo se na ta način izognili tudi etanolu, kar je še zlasti pomembno v primeru potencialne rabe alginatnih submikronskih delcev kot kapsulacijskih sistemov v živilski industriji.



Slika 35: Emulzije v različnih korakih priprave alginatnih submikronskih delcev, obarvane z barvilom Sudan II. Od leve proti desni: emulzija alginata v olju, emulzija nanodelcev CaCl_2 v olju in emulzija alginatnih submikronskih delcev v olju.

Figure 35: Sudan II coloured emulsions from different preparation steps of alginate submicron particles. From left to right: emulsion of alginate in oil, emulsion of CaCl_2 nanoparticles in oil and emulsion of alginate submicron particles in oil.



Slika 36: Alginatni submikronski delci v oljni fazi, obarvani z oranžnim barvilom Sudan II (a), alginatni submikronski delci v destilirani vodi po prvem koraku spiranja (b) ter alginatni submikronski delci v destilirani vodi po končanem spiranju (c).

Figure 36: Alginate submicron particles in oil coloured with Sudan II (a), alginate submicron particles in distilled water after first washing step (b), alginate submicron particles in distilled water after third washing step (c).

4.3.3 Učinkovitost kapsulacije in delež EGCG v alginatnih submikronskih delcih

Učinkovitost kapsulacije EGCG v alginatne submikronske delce je znašala $28 (\pm 2) \%$, delež EGCG v delcih pa je bil $0,9 (\pm 0,1) \%$. Učinkovitost kapsulacije je primerljiva z učinkovitostjo kapsulacije resveratrola z enako metodo kapsulacije ($25 (\pm 2) \%$) (Istenič in sod., 2015). Čeprav je topnost EGCG v jedilnih oljih nizka (Nwuha in sod., 1999), je velika specifična površina alginatnih kapljic/delcev botrovala k znatni difuziji EGCG v oljno fazo med samim postopkom priprave alginatnih delcev. Kljub temu sta enakomerna polimerizacija alginatnih submikronskih delcev in posledično njihova homogena in kompaktna sestava

pripomogli k bolj učinkoviti kapsulaciji kot v primeru kapsulacije EGCG v alginatne mikrodolce, pripravljene z metodo ekstruzije. O podobnih rezultatih poročajo tudi Sanna in sod. (2015), ki so EGCG kapsulirali v submikronske delce iz polikaprolaktona in alginata ter dosegli učinkovitost kapsulacije 30,6 (\pm 0,9) %. Delež EGCG v alginatnih delcih 0,9 (\pm 0,03) % je prav tako primerljiv z deleži vodotopnih učinkovin v submikronskih delcih, ki jih opisujejo Govender in sod. (1999) in se gibljejo od 0,2 % do 4,6 %.

4.3.4 Sproščanje EGCG iz alginatnih submikronskih delcev s Fickovim modelom in linearnim modelom superimpozicije

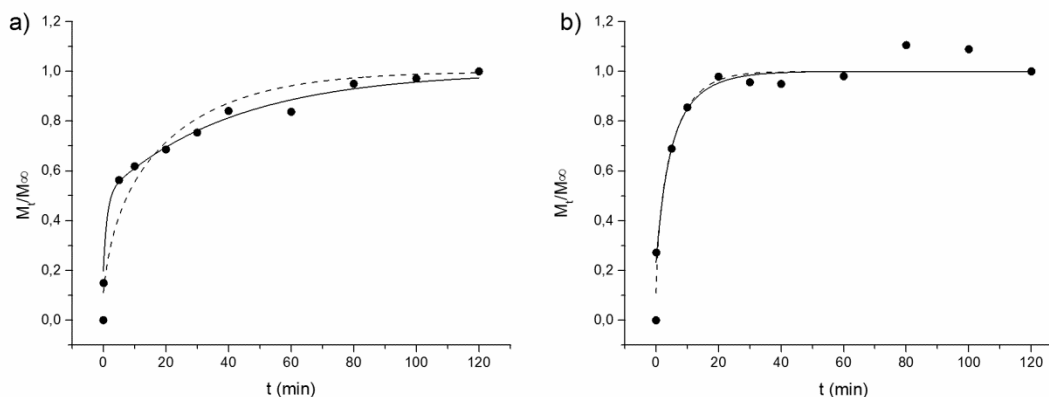
Profil sproščanja EGCG iz alginatnih delcev pri pH 1,2 in pH 7,2 in 37 °C je prikazan na sliki 37. Sproščanje EGCG je pri obeh vrednostih pH doseglo plato v roku 2 h. Delež sproščenega EGCG je znašal 20,6 (\pm 0,5) % pri pH 1,2 in 19,2 (\pm 0,3) % pri pH 7,2. Rezultati so primerljivi z deležem sproščenega resveratrola (17,3 (\pm 0,3) %); pri pH 1,2 in 7,2) iz alginatnih submikronskih delcev (Istenič in sod., 2015). Iz slike 37 je razvidno tudi, da je sproščanje EGCG iz alginatnih submikronskih delcev pogojeno s pH medija. Pri pH 7,2 je sproščanje EGCG nenadno in poteče v prvih 20 min, medtem ko je pri pH 1,2 sproščanje EGCG v prvih 10 min pospešeno, nato pa nadaljnje 1,5 h sledi postopno sproščanje EGCG. Da bi ocenili mehanizem sproščanja EGCG, smo eksperimentalne podatke ocenili s prileganjem dveh modelov: drugega Fickovega zakona (enačba 13) in linearnega modela superimpozicije (enačba 15). Krivulji prileganja sta prikazani na sliki 37a (pH 1,2) in 37b (pH 7,2), parametri modelov pa so predstavljeni v preglednici 11.

Pri pH 1,2 je linearni model superimpozicije bolje opisal eksperimentalne podatke v primerjavi s Fickovim modelom ($R^2 = 0,960$ v primerjavi z $R^2 = 0,806$), kar pomeni, da mehanizem sproščanja EGCG ne sledi striktno Fickovi difuziji. Pri pH 7,2 se je linearni model superimpozicije prav tako izkazal za bolj natančnega, čeprav ni bilo večjih razlik med koeficienti določenosti ($R^2 = 0,940$ v primerjavi z $R^2 = 0,939$). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Flores in sod. (2007), Pinheiro in sod. (2012) ter Pinheiro in sod., (2015), ki so opisovali sproščanje bioaktivnih komponent iz drugih polimernih nosilcev.

Parameter X je definiran kot prispevek Fickove difuzije pri sproščanju komponente iz submikronskih delcev. Vrednost parametra X , ki smo ga izračunali z uporabo linearnega modela superimpozicije, je pri obeh vrednostih pH višja od 0,5, kar pomeni, da je Fickova difuzija glavni mehanizem sproščanja EGCG. Enake rezultate smo dobili pri preučevanju sproščanja resveratrola iz alginatnih submikronskih delcev (Istenič in sod., 2015).

Višja vrednost konstante Fickove difuzije k_F ter hkrati nižja vrednost relaksacijske konstante k_R pri pH 1,2 v primerjavi s pH 7,2 je v skladu z bolj upočasnjeno sproščanjem EGCG iz alginatnih submikronskih delcev pri pH 1,2. Bolj upočasnjeno sproščanje bioaktivnih

komponent iz alginatnih nosilcev pri kislem pH v primerjavi z alkalnim pH opisujejo tudi Madziva in sod. (2006) ter Soni in sod. (2010). V kislem mediju pride do krčenja alginatnih mrež ter sproščanja komponent z difuzijo, medtem ko v alkalnem mediju pride do erozije alginatnih delcev ter sproščanja kapsuliranih komponent tako z difuzijo kot zaradi procesov relaksacije polimera.



Slika 37: Opis sproščanja EGCG iz alginatnih submikronskih delcev s Fickovim modelom (enačba 13) (---) in linearnim modelom superimpozicije (enačba 15) (—) pri 37 °C v 0,1 M HCl (pH 1,2) (a) in v fosfatnem pufru (pH 7,2) (b). M_t/M_∞ pomeni delež sproščenega EGCG ob času t.

Figure 37: Fick's (equation 13) (---) and linear superimposition model (equation 15) (—) description of EGCG release from alginate submicron particles at 37 °C in 0.1 M HCl (pH 1.2) (a) and in phosphate buffered saline (pH 7.2) (b). M_t/M_∞ is a fraction of EGCG released at time t.

Preglednica 11: Rezultati prilaganja linearnega modela superimpozicije (enačba 15) eksperimentalnim podatkom s podanim koeficientom določenosti (R^2) in celotno napako (RMSE). X – delež komponente, sproščene s Fickovim transportom, k_F – konstanta Fickove difuzije, k_R – relaksacijska konstanta. Parameter SHW % je podan v oklepajih.

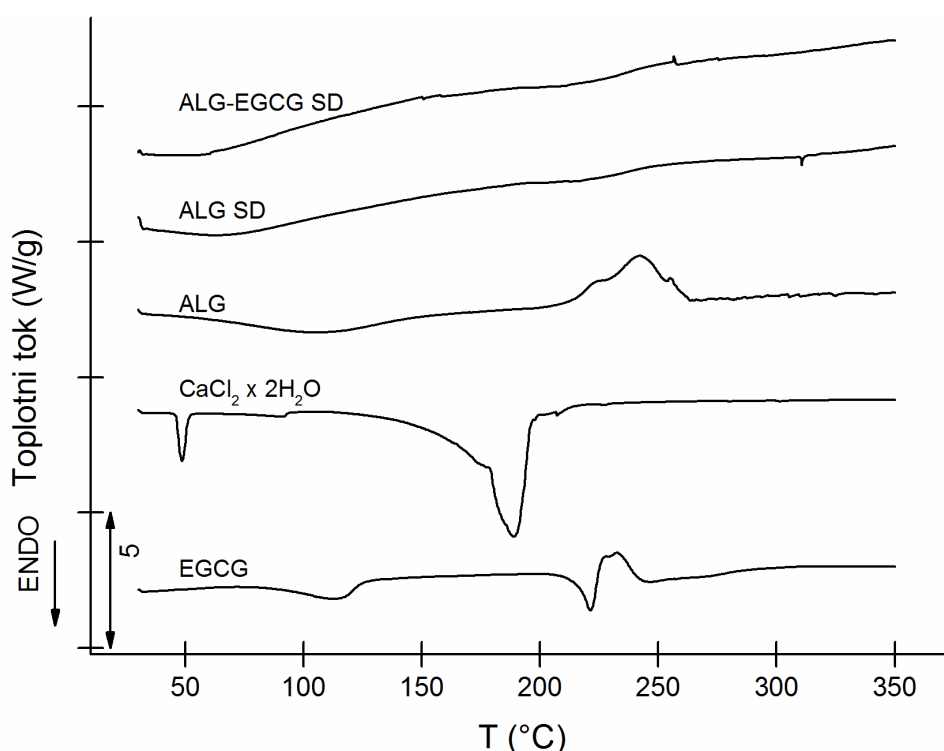
Table 11: The results of fitting the linear superimposition model (equation 15) to experimental data of EGCG release. Evaluation of the quality of the regression on the basis of determination coefficient (R^2) and squared root mean square error (RMSE). X – the fraction of the compound released by Fickian transport, k_F – Fickian diffusion rate constant, k_R – relaxation rate constant. Standardized halved width (SHW%) is given in brackets.

pH	RMSE	R^2	X	k_F (min^{-1})	k_R (min^{-1})
1,2	$1,1 \times 10^{-2}$	0,960	0,503 (8,325 %)	0,864 (224,8 %)	0,025 (13,33 %)
7,2	$2,0 \times 10^{-2}$	0,940	0,592 (28,03 %)	0,321 (72,58 %)	0,109 (40,52 %)

4.3.5 Preučevanje termičnih prehodov in interakcij med EGCG in alginatnimi submikronskimi delci

Značilnosti termičnih prehodov posameznih spojin (EGCG, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, alginat) ter alginatnih submikronskih delcev z in brez EGCG smo preučevali z meritvami DSC. Rezultati meritev DSC so predstavljeni kot krivulje toplotnega toka v odvisnosti od temperature na sliki

38. Iz krivulje za alginat je razvidno, da v temperaturnem območju od 210 °C do 265 °C pride do razgradnje alginata, kar se kaže kot več zaporednih eksotermnih vrhov. Na krivulji alginatnih submikronskih delcev ni bilo prisotnih endotermnih vrhov pri temperaturah taljenja 48 °C in 176 °C, značilnih za CaCl_2 , kar kaže na odsotnost kristalne oblike CaCl_2 ter potrjuje interakcije med alginatom in CaCl_2 . Krivulja DSC EGCG kaže endotermni vrh pri 220 °C, kar odgovarja temperaturi taljenja EGCG (Ramkumar in sod., 2015). Na krivuljah alginatnih submikronskih delcev brez oziroma s kapsuliranim EGCG je razviden eksotermne vrh z začetkom pri okoli 220 °C, ki je prisoten tudi na krivulji čistega alginata in pomeni njegovo razgradnjo (González-Rodríguez in sod., 2002). Na krivulji alginatnih submikronskih delcev s kapsuliranim EGCG nismo opazili vrha, ki bi ustrežal taljenju EGCG, kar pomeni, da je EGCG v amorfem trdnem stanju dispergiran v alginatni matrici (Makraduli in sod., 2013). Podobne rezultate smo dobili v primeru kapsulacije resveratrola v alginatne submikronske delce. Na krivulji alginatnih delcev s kapsuliranim resveratrolom je bil vrh, značilen za resveratrol, odsoten, po čemer smo sklepali, da je prišlo do vgradnje resveratrola v alginatne delce (Istenič in sod., 2015).



Slika 38: Krivulje DSC EGCG, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, alginata (ALG), alginatnih submikronskih delcev (ALG SD) ter alginatnih submikronskih delcev s kapsuliranim EGCG (ALG-EGCG SD).

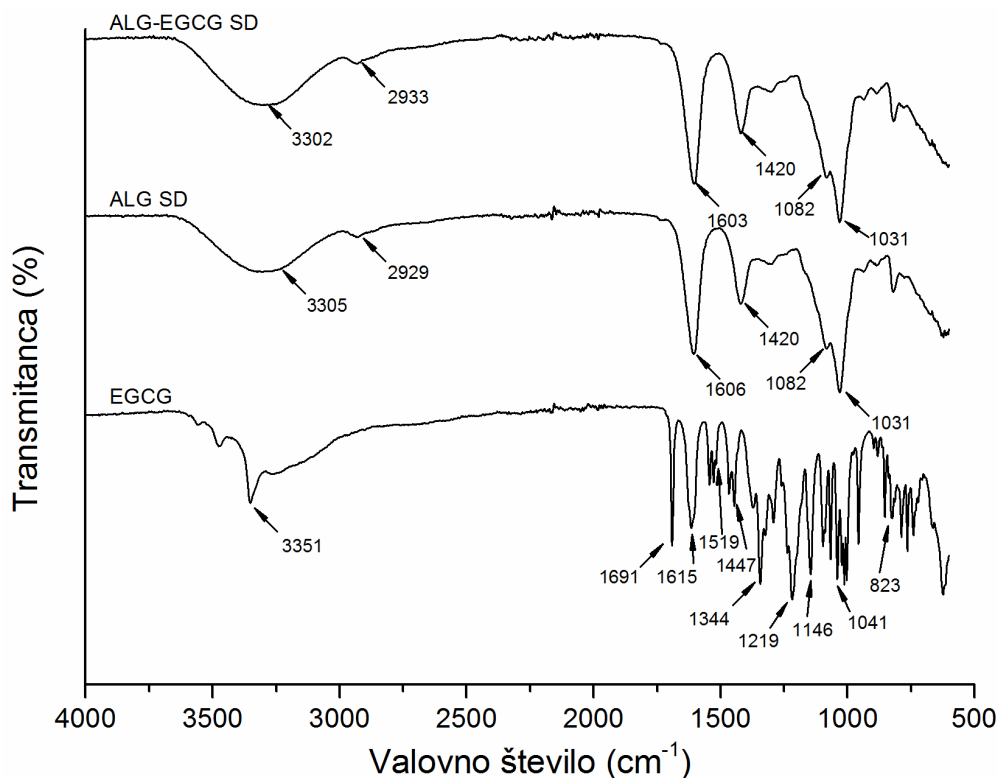
Figure 38: DSC curves of EGCG, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, alginate (ALG), alginate submicron particles (ALG SD) and alginate submicron particles with encapsulated EGCG (ALG-EGCG SD).

Interakcije med EGCG in alginatnimi submikronskimi delci smo preučevali z meritvami FTIR. Posneli smo spektre prostega EGCG, praznih alginatnih submikronskih delcev ter

alginatnih submikronskih delcev s kapsuliranim EGCG. Iz spektra FTIR alginatnih submikronskih delcev je razvidnih več značilnih vrhov: vrh pri 3305 cm^{-1} ustreza skupini -OH , vrh pri 2929 cm^{-1} kaže na prisotnost skupin -CH_2 (C-H vzdolžno nihanje), dva specifična močna absorpcijska vrhova pri 1606 cm^{-1} in 1420 cm^{-1} ustrejata asimetričnemu in simetričnemu vzdolžnemu nihanju skupin COO^- na polimerni verigi, močnejši vrh pri 1031 cm^{-1} in šibkejši vrh pri 1082 cm^{-1} pa pripisujemo vzdolžnim vibracijam skupin C-O-C (ciklični eter) (slika 39).

Spekter FTIR EGCG se sklada s spektri FTIR iz literature. Prisotnih je več značilnih vrhov pri valovnih številih 823, 1041, 1146, 1219, 1344, 1447, 1519, 1615 in 1691 cm^{-1} , ki jih pripisujemo naslednjim skupinam: C-H alkenov, -C-O alkoholov, C-OH alkoholov, -OH aromatskih skupin, C-O alkoholov, C-H alkanov, C=C aromatskega obroča, C=C alkenov ter C=O galne kisline. Absorpcijski trakovi pri valovnih številih, višjih od 3200 cm^{-1} , pomenijo vibracijo O-H vezi fenolnih in hidroksilnih skupin (Tang in sod., 2013; Zou in sod., 2014).

Iz spektra alginatnih submikronskih delcev s kapsuliranim EGCG so razvidni enaki vrhovi kot v primeru praznih alginatnih submikronskih delcev. Vrhovi, ki so značilni za EGCG, na tem spektru niso prisotni. Podobna opažanja opisujejo Mohammadi in sod. (2014), ki so kapsulirali vitamin D3 v nanoliposome. Vrhovi na spektrih praznih liposomov in liposomov s kapsuliranim vitaminom D3 so bili identični, kar pomeni, da med bioaktivno komponento in nosilcem ni prišlo do kemijskih interakcij. Tudi v našem primeru lahko sklepamo, da med alginatom in EGCG ni prišlo do kemijskih interakcij temveč so molekule EGCG zgolj fizično ujete v alginatno mrežo submikronskih delcev.



Slika 39: Spektri FTIR EGCG, alginatnih submikronskih delcev (ALG SD) in alginatnih submikronskih delcev s kapsuliranim EGCG (ALG-EGCG SD).

Figure 39: FTIR spectra of EGCG, alginate submicron particles (ALG SD) and alginate submicron particles with encapsulated EGCG (ALG-EGCG SD).

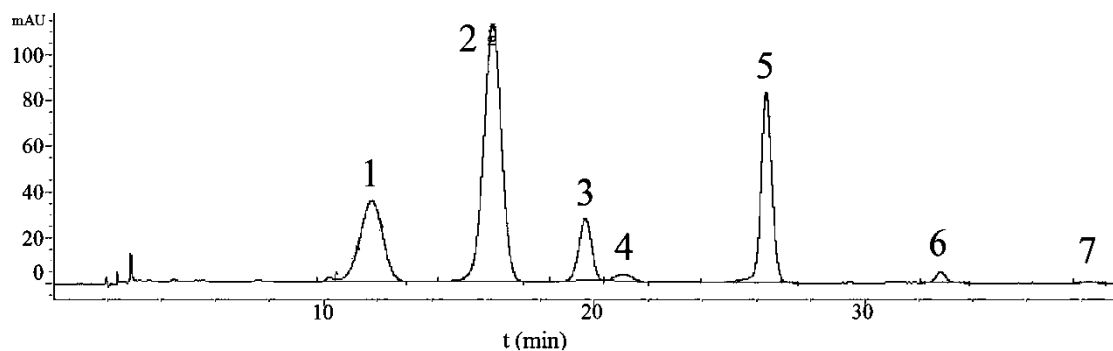
4.4 KAPSULACIJA SOKA GRANATNEGA JABOLKA

V četrtem delu smo se posvetili vgradnji soka granatnega jabolka v polisaharide alginat, pektin, hitozan in pululan z metodo liofilizacije. Poleg zaščite bioaktivnih snovi v soku granatnega jabolka je bil cilj kapsulacije tudi olajšano rokovanje s sokom. Nastale delce smo okarakterizirali glede na morfologijo, učinkovitost kapsulacije in parametre CIE $L^*a^*b^*$. Stabilnost vgrajenih komponent smo spremljali pri temperaturi 60 °C; ob vnaprej določenih časovnih točkah smo določevali celokupne polifenolne spojine, antioksidativno aktivnost, celokupno vsebnost antocianinov in parametre CIE $L^*a^*b^*$. Liofilizirane vzorce soka granatnega jabolka in polisaharidov smo dodali tudi v jogurt in spremljali stabilnost bioaktivnih komponent med shranjevanja jogurta pri 4 °C.

4.4.1 Določanje antocianinov v soku granatnega jabolka s HPLC

Profil antocianinov v soku granatnega jabolka je prikazan na sliki 40 (povzeto po Slatinek, 2015). Na podlagi ujemanja retencijskih časov antocianinov v vzorcu z retencijskimi časi standardov smo v soku granatnega jabolka identificirali 7 različnih antocianinov. Vsebnost

antocianinov variira glede na sorto granatnega jabolka, vendar smo kljub temu v našem vzorcu soka zaznali več najpogosteje zastopanih antocianinov (cianidin-3-glukozid, cianidin-3,5-diglukozid, delphinidin-3-glukozid, pelargonidin-3,5-diglukozid, pelargonidin-3-glukozid (Jaiswal in sod., 2010)).



Številka vrha	Antocianin
1	delfinidin-3,5-diglukozid
2	cianidin-3,5-diglukozid
3	delfinidin-3-glukozid
4	pelargonidin-3,5-diglukozid
5	cianidin-3-glukozid
6	pelargonidin-3-glukozid
7	cianidin-3-arabinozid

Slika 40: Reprezentativni HPLC kromatogram soka granatnega jabolka z identificiranimi antocianini (povzeto po Slatinek, 2015).

Figure 40: Representative HPLC chromatogram of pomegranate juice with identified anthocyanins (adapted from Slatinek, 2015).

4.4.2 Priprava suspenzij izbranih polisaharidov v soku granatnega jabolka in liofilizacija

Opažanja, do katerih smo prišli pri pripravi liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti različnih polisaharidov, so povzeta v preglednici 12. Pri pripravi liofiliziranih vzorcev s hitozanom smo imeli težave zaradi topnosti hitozana, ki se kljub zakisanju soka z očetno kislino (1 % (v/v)) ni raztapljal. V primeru pululana so po liofilizaciji nastali vzorci lepljive teksture, ki so na pogled izgledali enako kot liofiliziran sok. Kot taki, liofilizirani vzorci s pululanom niso olajšali rokovanja z jedrno komponento, kar je eden od ciljev mikrokapsulacije. Pri liofilizaciji soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata ali pektina so bili nastali vzorci večinoma v obliki lepljivega prahu in so kot taki omogočali nadaljnjo karakterizacijo.

Preglednica 12: Opažanja o nastanku liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti različnih polisaharidov.

Table 12: Observations on formation of lyophilized samples of pomegranate juice and different polysaccharides.

	Masno razmerje soka in polisaharida		
	66,7:1	50:1	25:1
Hitozan	Se ni raztopljal v soku		
Pululan	Lepljiva konsistenca		
Alginat	Lepljiv prah, tvori večje grude	Lepljiv prah	Prah
Pektin	Lepljiv prah, tvori večje grude	Lepljiv prah	Lepljiv prah

4.4.3 Učinkovitost kapsulacije

Učinkovitost kapsulacije soka granatnega jabolka v nosilce iz alginata oziroma pektina je znašala od 51 (± 2) % do 76 (± 5) % (preglednica 13). Zmanjšanje masnega razmerja med sokom in alginatom oziroma pektinom iz 66,7:1 na 50:1 je pripomoglo k boljši učinkovitosti kapsulacije. Zmanjšanje masnega razmerja med sokom in polisaharidom iz 50:1 na 25:1 je v primeru pektina prav tako pripomoglo k izboljšanju učinkovitosti kapsulacije, medtem ko v primeru alginata ni bilo razlik.

Merjenje barvnih parametrov je pokazalo, da se je ob zmanjšanju masnega razmerja med sokom in alginatom oziroma pektinom iz 66,7:1 na 50:1 povečala svetlost vzorcev (L^*). Povečana svetlost pomeni manjšo prisotnost komponent soka na površini vzorcev in sovпада z večjo učinkovitostjo kapsulacije (Luca in sod., 2013). Nadaljnje zmanjšanje masnega razmerja na 25:1 ni bistveno vplivalo na spremembo svetlosti L^* (preglednica 13).

Glede na učinkovitost kapsulacije ter opažanja o tvorbi liofiliziranih vzorcev smo se v nadaljnjem delu osredotočili na liofilizirane vzorce soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata oziroma pektina z masnimi razmerji 50:1 in 25:1. Liofilizirane vzorce smo nadalje okarakterizirali na podlagi določanja antioksidativne aktivnosti, vsebnosti fenolnih spojin in antocianinov, barvne analize ter testov stabilnosti.

Preglednica 13: Učinkovitost kapsulacije soka granatnega jabolka v alginat (ALG) oziroma pektin (PEK) ter vrednost parametra L^* (svetlost) liofiliziranih vzorcev.

Table 13: Encapsulation efficiency of pomegranate juice into alginate (ALG) or pectin (PEK) matrices and the L^* (lightness) value of the lyophilized samples.

	Učinkovitost kapsulacije (%)	L^*
SOK: ALG = 66,7: 1	60 \pm 1	33,9 \pm 0,6
SOK: ALG = 50: 1	75 \pm 5	62 \pm 2
SOK: ALG = 25: 1	75 \pm 2	63 \pm 1
SOK: PEC = 66,7: 1	51 \pm 2	49,1 \pm 0,2
SOK: PEC = 50: 1	59 \pm 5	67 \pm 2
SOK: PEC = 25: 1	65 \pm 2	66 \pm 2

4.4.4 Karakterizacija soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev

Vsebnost celokupnih polifenolnih spojin in antocianinov ter antioksidativna aktivnost liofiliziranega soka granatnega jabolka ter liofiliziranih vzorcev soka z alginatom ali pektinom so prikazani v preglednici 14. Vsebnost celokupnih polifenolnih spojin v soku je znašala 429 (\pm 8) mg/l ekvivalentov klorogenske kisline (KK). Z uporabo drugih standardov so Vardin in Fenercioglu (2003) v soku granatnega jabolka določili 1564 mg/l ekvivalentov galne kisline, Gil in sod. (2000) so v soku določili 2117 mg/l ekvivalentov p-kumarne kisline, Li in sod. (2006) pa so v pulpi granatnega jabolka določili 24,4 mg/g ekvivalentov taninske kisline.

Vsebnost celokupnih antocianinov v soku granatnega jabolka je znašala 260 (\pm 1) mg/l cianidin-3-glukozida. Vrednost je primerljiva s podatki iz literature; Tehranifar in sod. (2010) so v različnih iranskih sortah granatnega jabolka določili 56-301 mg/l cianidin-3-glukozida, Çam in sod. (2009) so v osmih različnih sortah granatnega jabolka določili 81-369 mg/l ekvivalentov cianidin-3-glukozida, Gil in sod. (2000) pa so v soku svežih zrn določili 306 mg/l celokupnih antocianinov. Širok razpon vsebnosti antocianinov lahko pripišemo visoki genetski raznolikosti različnih sort granatnega jabolka (Türkyilmaz, 2013).

Antioksidativna aktivnost prostega soka je znašala 9,3 % (\pm 0,2 %). Vrednosti antioksidativne aktivnosti soka granatnega jabolka v literaturi se gibljejo od 15,59-40,72 % (Tehranifar in sod., 2010) oziroma 10,37-67,46 % (Tezcan in sod., 2009). Nižje vrednosti antioksidativne aktivnosti v našem primeru so verjetno posledica daljšega časa skladiščenja soka granatnega jabolka, med katerim je lahko prišlo do razgradnje bioaktivnih komponent.

Po vgradnji soka granatnega jabolka v alginat oziroma pektin nismo zaznali večjih sprememb v vsebnosti celokupnih fenolnih spojin in antocianinov ter v antioksidativni aktivnosti. Iz rezultatov sklepamo, da postopek vgradnje ter izbrani nosilci niso imeli negativnega vpliva na stabilnost aktivnih komponent ter tako predstavljajo potencialno uporaben sistem za kapsulacijo soka granatnega jabolka.

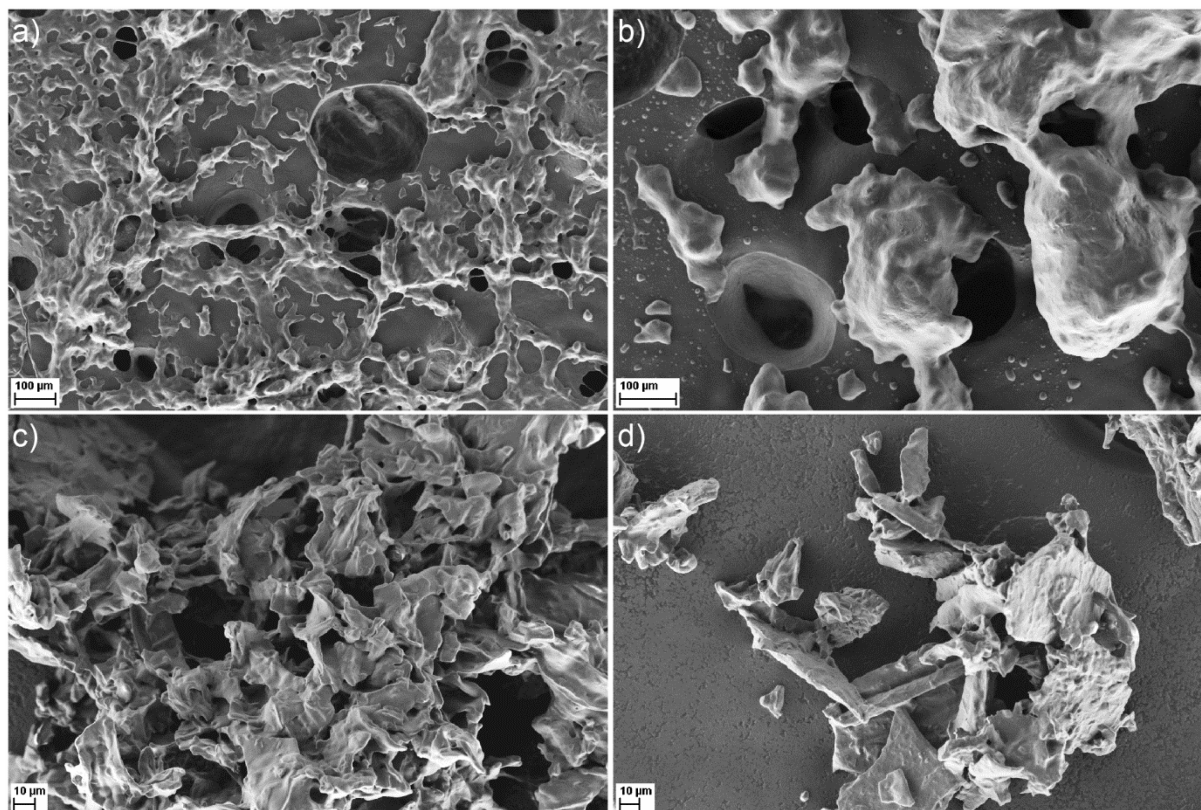
Preglednica 14: Vsebnost celokupnih fenolnih spojin in antocijaninov ter antioksidativna aktivnost soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka z alginatom (ALG) oziroma pektinom (PEK). KK – klorogenska kislina, cin-3-glu – cianidin-3-glukozid. Antioksidativna aktivnost je izražena kot delež inhibicije prostih radikalov (%).

Table 14: Total polyphenols and anthocyanins content and antioxidant activity of pomegranate juice and lyophilized samples of pomegranate juice with alginate (ALG) or pectin (PEC). KK – chlorogenic acid, cin-3-glu – cianidin-3-glukozid. Antioxidant activity is expressed as percentage of free radical inhibition (%).

	SOK	SOK: ALG = 50:1	SOK: PEK = 50:1	SOK: ALG = 25:1	SOK: PEK = 25:1
polifenoli (μg KK/mg vzorca)	2,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	2,29 \pm 0,03	2,76 \pm 0,01
antocijanini (μg cin-3-glu/mg vzorca)	1,20 \pm 0,01	1,13 \pm 0,03	0,90 \pm 0,01	1,13 \pm 0,02	1,14 \pm 0,08
antioksidativna aktivnost (%)	14,0 \pm 0,3	15,7 \pm 0,3	13,7 \pm 0,4	14,9 \pm 0,5	18,3 \pm 0,3

4.4.5 Morfologija liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata oziroma pektina

Morfologijo liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v kombinaciji z alginatom ali pektinom v različnih masnih razmerjih smo opazovali s SEM. Liofilizirani vzorci so izkazovali oblike, značilne za liofilizirane suspenzije polisaharidov (slika 41). V primeru liofiliziranih vzorcev soka z alginatom ali pektinom v masnem razmerju 50:1 (sliki 41a, 41b) ni razvidne prisotnosti posameznih delcev. Pri liofiliziranih vzorcih soka z alginatom ali pektinom v masnem razmerju 25:1 so prisotne nagubane strukture z ostrejšimi robovi, kar kaže na prisotnost ločenih delcev (sliki 41c, 41d). Takšni rezultati so pričakovani, saj manjše razmerje med sokom in polisaharidom omogoča boljšo učinkovitost kapsulacije ter s tem manj komponent soka na površini delcev, s čimer se zmanjša zlepljanje delcev med seboj.



Slika 41: Slike SEM liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom v različnih masnih razmerjih; sok in alginat v masnem razmerju 50:1 (a), sok in pektin v masnem razmerju 50:1 (b), sok in alginat v masnem razmerju 25:1 (c), sok in pektin v masnem razmerju 25:1 (d).

Figure 41: SEM images of lyophilized samples of pomegranate juice and alginate or pectin in different mass ratios: pomegranate juice and alginate in mass ratio 50:1 (a) pomegranate juice and pectin in mass ratio 50:1 (b), pomegranate juice and alginate in mass ratio 25:1 (c) and pomegranate juice and pectin in mass ratio 25:1 (d).

4.4.6 Test stabilnosti

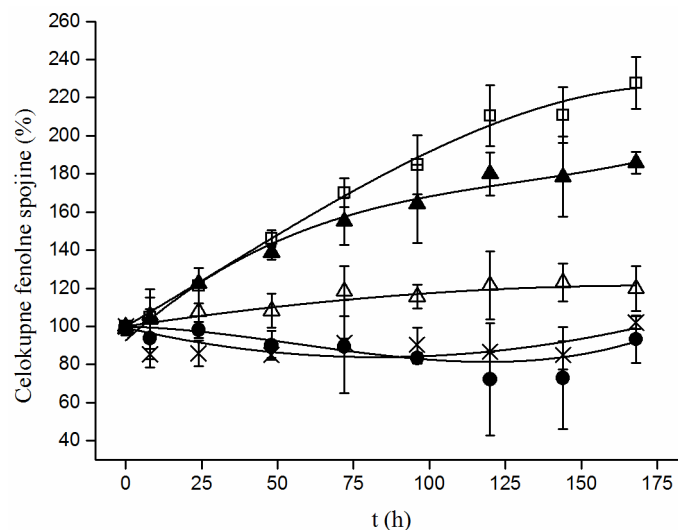
Zaščitno vlogo alginata oziroma pektina pri stabilizaciji soka granatnega jabolka smo preučevali z izpostavitvijo liofiliziranih vzorcev temperaturi 60 °C. Liofilizirane vzorce smo inkubirali v temi v pečici s kontrolirano temperaturo ter ob vnaprej določenih časih določali preostanek fenolnih spojin in antocijaninov ter antioksidativno aktivnost. Spreminjanje barve vzorcev smo spremljali z določanjem parametrov barvnega prostora L^* , a^* , b^* .

4.4.6.1 Vsebnost celokupnih fenolnih spojin

Vsebnost celokupnih fenolnih spojin v soku ter v liofiliziranih vzorcih v odvisnosti od časa inkubacije pri 60 °C je prikazana na sliki 42. V primeru liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka s pektinom smo nepričakovano zaznali povečanje vsebnosti fenolnih spojin. Andary in sod. (2013) so prišli do podobnih rezultatov pri segrevanju fenolnega izvlečka olivnih

koščic pri 60 °C; po prvotnem padcu celokupnih fenolnih spojin so po 60 min z metodo Folin-Ciocalteu zaznali porast na začetno vrednost. Vzporedno so kot kontrolo na enak način tretirali raztopine ksiloze in glukoze ter ugotovili, da so tretirane raztopine povzročile redukcijo reagenta Folin-Ciocalteu ter posledično porast absorbance. Dlje časa, kot so omenjene raztopine segrevali pri 60 °C, bolj intenzivna je bila obarvanost reagenčne mešanice. Iz tega lahko sklepamo, da so za povečanje absorbance odgovorni razpadni produkti monosaharidov; poleg fenolnih spojin lahko namreč tudi nekatere druge spojine vplivajo na reagent Folin-Ciocalteu in povzročijo njegovo redukcijo. V našem primeru smo kot kontrolo uporabili suspenzijo pektina, s katero smo postopali enako kot z liofiliziranimi vzorci, vendar pri določanju celokupnih fenolnih spojin ni prišlo do modrega obarvanja reagenta Folin-Ciocalteu. Tako sklepamo, da je bila za redukcijo reagenta ključna kombinacija pektina in razgradnjih produktov soka granatnega jabolka. S podaljševanjem časa inkubacije pri 60 °C je nastajalo vse več razgradnjih produktov soka granatnega jabolka, ki so v prisotnosti pektina reagirali z reagentom Folin-Ciocalteu in povzročili modro obarvanost raztopine.

Z metodo Folin-Ciocalteu nismo zaznali značilnih sprememb v vsebnosti fenolnih spojin v soku, medtem ko smo v primeru liofiliziranih vzorcev soka z alginatom v razmerjih 50:1 in 25:1 zaznali rahlo znižano vsebnost fenolnih spojin v odvisnosti od časa. Robert in sod. (2010) so na podoben način inkubirali sok granatnega jabolka pri 60 °C ter s testom Folin-Ciocalteu po 7 dneh inkubacije zaznali znatno znižano koncentracijo fenolnih spojin. V našem primeru je na podlagi uporabljene metode težko sklepati o dejanski vsebnosti fenolnih spojin, saj smo pokazali, da lahko prihaja tudi do interakcij med razpadnimi produkti soka granatnega jabolka in reagentom Folin-Ciocalteu. Za natančnejšo kvantifikacijo bi torej morali uporabiti dodatne kromatografske metode določanja fenolnih spojin.



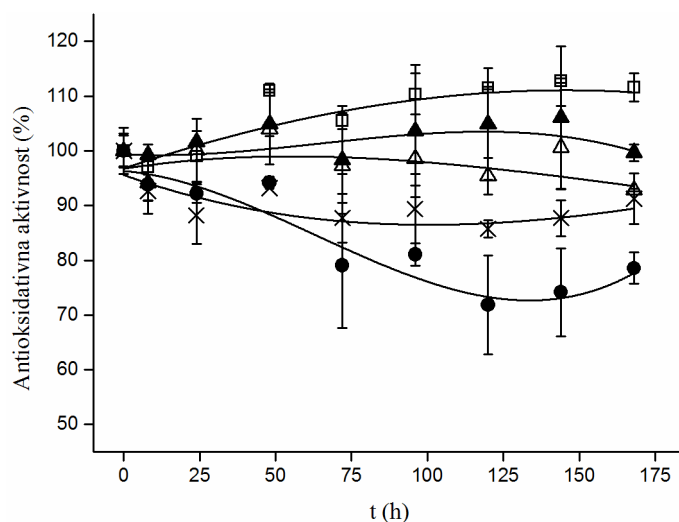
Slika 42: Vsebnost celokupnih fenolnih spojin v soku granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcih soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata ali pektina, inkubiranih v temi pri 60 °C. Δ liofiliziran sok granatnega jabolka, ● liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 50:1, □ liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 50:1, × liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 25:1, ▲ liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 25:1.

Figure 42: Total polyphenols in pomegranate juice and in lyophilized samples of pomegranate juice with alginate or pectin, incubated at 60 °C, in dark. Δ lyophilized pomegranate juice, ● lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 50:1, □ lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 50:1, × lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 25:1, ▲ lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 25:1.

4.4.6.2 Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost soka granatnega jabolka ter liofiliziranih vzorcev soka z alginatom oziroma pektinom med inkubacijo pri 60 °C je prikazana na sliki 43. Antioksidativna aktivnost se je v primeru soka s časom rahlo zmanjšala. Prisotnost alginata ni imela zaščitne vloge pri vzdrževanju antioksidativne aktivnosti soka granatnega jabolka; izrazito zmanjšanje antioksidativne aktivnosti je razvidno zlasti v primeru liofiliziranih vzorcev z masnim razmerjem soka in alginata 50:1. V nasprotju s pričakovanji smo v primeru liofiliziranih vzorcev soka s pektinom zaznali povečano antioksidativno aktivnost, zlasti pri masnem razmerju soka in pektina 50:1. Razgradnji produkti nekaterih fenolnih spojin lahko izkazujejo antioksidativno aktivnost in na ta način doprinejo k povečani celokupni antioksidativni aktivnosti vzorca (Scalia in sod., 2013; Pereira in sod., 2014). Poleg tega je možno, da med segrevanjem liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka in pektina poteče Maillardova reakcija. Maillardova reakcija je kemijska reakcija med karbonilnimi skupinami reducirajočih sladkorjev in amino skupinami aminokislin, peptidov in proteinov. Produkti Maillardove reakcije so melanoidini, heterogeni rjavi pigmenti, ki jih povezujejo z različnimi kemijskimi in biološkimi značilnostmi, med drugimi tudi z antioksidativnim delovanjem (Opitz in sod.,

2014; Wang in sod., 2011). Tvorba melanoidinov bi bila v našem primeru lahko odgovorna za povečano antioksidativno aktivnost liofiliziranih vzorcev soka in pektina. To sklepanje je potrdila tudi vizualna ocena, saj so bili liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v nasprotju s prostim sokom ter z liofiliziranimi vzorci soka z alginatom po inkubaciji na 60 °C obarvani rjavo (razvidno tudi iz izvlečkov antocianinov na sliki 45).



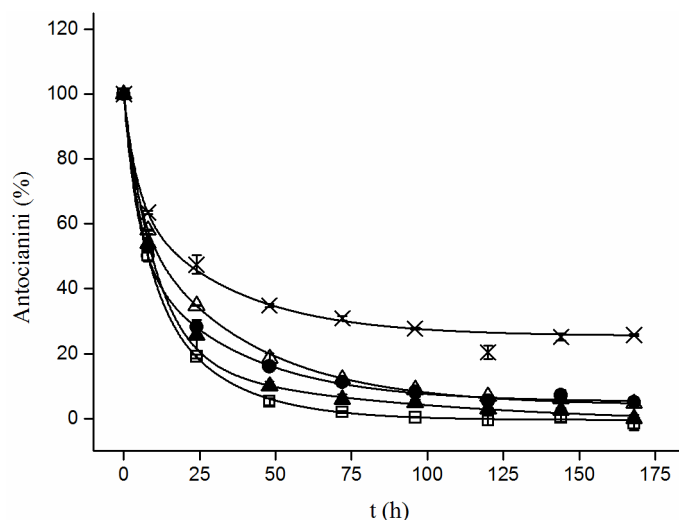
Slika 43: Antioksidativna aktivnost soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom oziroma pektinom, inkubiranih v temi pri 60 °C. Δ liofiliziran sok granatnega jabolka, ● liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 50:1, □ liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 50:1, × liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 25:1, ▲ liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 25:1.

Figure 43: Antioxidant activity of pomegranate juice and lyophilized samples of pomegranate juice with alginate or pectin, incubated at 60 °C, in dark. Δ lyophilized pomegranate juice, ● lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 50:1, □ lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 50:1, × lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 25:1 and ▲ lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 25:1.

4.4.6.3 Vsebnost antocianinov

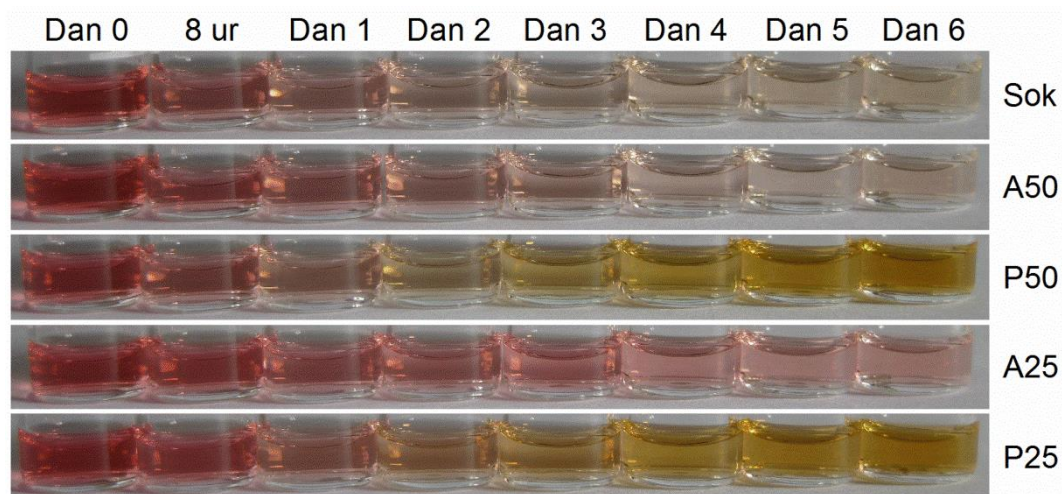
Stabilnost antocianinov v liofiliziranih vzorcih soka granatnega jabolka z alginatom oziroma pektinom smo spremljali s pH-diferencialno metodo. S časom inkubacije pri 60 °C je prišlo do značilnega upada vsebnosti antocianinov (slika 44), ki je najverjetneje posledica oksidacije antocianinov in kondenzacije antocianinov z askorbinsko kislino. Razgradnjo antocianinov lahko pospešijo tudi stranski produkti razgradnje askorbinske kisline in/ali monosaharidov, prisotnih v soku (Choi in sod., 2002; Alighourchi in Barzegar, 2009). Po 168 h inkubacije smo v primeru soka določili 4,65 (± 0,06) % začetne vsebnosti antocianinov, podobno smo v liofiliziranih vzorcih soka z alginatom v razmerju 50:1 določili 5 (± 1) % začetne vsebnosti antocianinov. V primeru liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka s pektinom po 168 h inkubacije pri 60 °C antocianinov v vzorcih nismo več zaznali. Edini vzorec, ki je doprinesel

k ohranitvi antocijaninov, je bil liofiliziran vzorec soka z alginatom v masnem razmerju 25:1; po 168 h inkubacije pri 60 °C smo v vzorcih določili 25,8 (\pm 0,3) % začetne vrednosti antocijaninov. Na sliki 45 so ampule z izvlečki antocijaninov iz liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom oziroma pektinom po različnih časih inkubacije pri 60 °C. Iz slike lahko ocenimo, da so liofilizirani vzorci soka in alginata v razmerju 25:1 pripomogli k ohranitvi antocijaninov, medtem ko so liofilizirani vzorci soka in pektina celo pospešili nastanek rjavo obarvanih produktov.



Slika 44: Delež preostalih antocijaninov v soku granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcih soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom, inkubiranih v temi pri 60 °C. Δ liofiliziran sok granatnega jabolka, \bullet liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 50:1, \square liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 50:1, \times liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 25:1, \blacktriangle liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 25:1.

Figure 44: Percentage of remaining anthocyanins in pomegranate juice and in lyophilized samples from pomegranate juice with alginate or pectin, incubated at 60 °C, in dark. Δ lyophilized pomegranate juice, \bullet lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 50:1, \square lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 50:1, \times lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 25:1, \blacktriangle lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 25:1.



Slika 45: Izvlečki antocijaninov iz liofiliziranega soka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom oziroma pektinom po različnih časih inkubacije pri 60 °C. Sok – liofiliziran sok granatnega jabolka, A50 – sok in alginat v masnem razmerju 50:1, P50 – sok in pektin v masnem razmerju 50:1, A25 – sok in alginat v masnem razmerju 25:1, P25 – sok in pektin v masnem razmerju 25:1.

Figure 45: Anthocyanin extracts from lyophilized pomegranate juice and lyophilized samples of pomegranate juice with alginate or pectin after different times of incubation at 60 °C. Sok – lyophilized pomegranate juice, A50 – pomegranate juice and alginate in mass ratio 50:1, P50 – pomegranate juice and pectin in mass ratio 50:1, A25 – pomegranate juice and alginate in mass ratio 25:1, P25 – pomegranate juice and pectin in mass ratio 25:1.

4.4.6.4 Barvne analize

Pri preučevanju kakovosti barve je poleg merjenja koncentracije pigmentov pomembno tudi merjenje barve, saj v primerih nekaterih sadnih produktov spremembe barve ne moramo okarakterizirati le na podlagi spremembe v koncentraciji antocijaninov (Wrolstad in sod., 2005). Variacije parametrov L^* , a^* in b^* liofiliziranega soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka z alginatom oziroma pektinom med inkubacijo pri 60 °C so prikazane na sliki 46. Parameter L^* , ki predstavlja svetlost, je pri vseh vzorcih sprva narasel, nato pa je ostal bolj ali manj nespremenjen. Povišanje vrednosti parametra L^* pomeni bledenje barve soka oziroma liofiliziranih vzorcev, kar sovpada z izgubo antocijaninov med segrevanjem. Vrednost parametra L^* se je v primeru liofiliziranih vzorcev soka in pektina v masnem razmerju 25:1 po 150 h inkubacije pričela zniževati, kar je po vsej verjetnosti posledica nastanka rjavo obarvanih produktov.

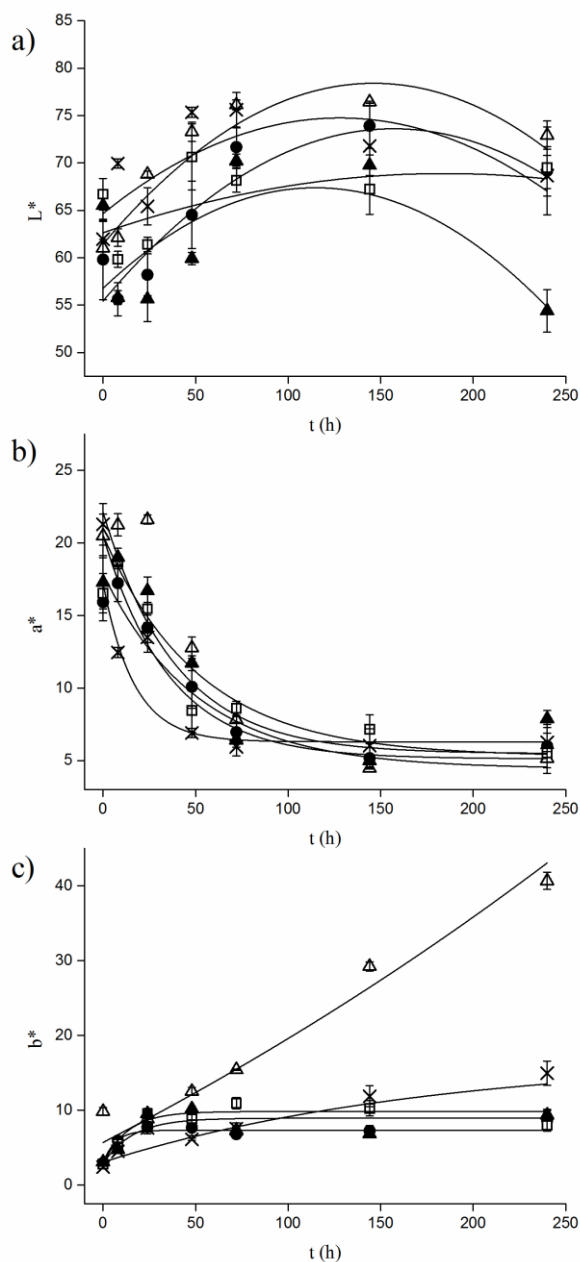
Parameter a^* predstavlja barve na osi zelena (negativne vrednosti) – rdeča (pozitivne vrednosti). Pri soku je začetna vrednost a^* višja kot pri liofiliziranih vzorcih soka v prisotnosti polisaharidov, kjer je prisotnih manj površinskih antocijaninov. Pri vseh vzorcih je s časom inkubacije prišlo do znižanja vrednosti parametra a^* , kar kaže na izginevanje tipične rdeče barve soka granatnega jabolka in sovpada z razgradnjo in polimerizacijo antocijaninov (Alighourchi in Barzegar, 2009). Parameter b^* predstavlja barve na osi modra (negativne

vrednosti) – rumena (pozitivne vrednosti). Pri vseh vzorcih smo zaznali povečanje vrednosti parametra b^* , ki je bila v primeru soka še posebej izrazita ter prav tako sovпада z zmanjševanjem koncentracije antocianinov (Fischer in sod., 2013).

Celokupno spremembo barve (ΔE) liofiliziranih vzorcev smo izračunali na podlagi parametrov L^* , a^* , b^* pred in med segrevanjem vzorcev. ΔE je bil najvišji v primeru prostega soka granatnega jabolka in je po 240 h inkubacije pri 60 °C znašal 43,2 ($\pm 0,7$) (slika 47a). V primeru liofiliziranih vzorcev soka v prisotnosti polisaharidov je bil ΔE znatno nižji in je po 240 h inkubacije pri 60 °C znašal od 13 (± 1) v primeru liofiliziranih vzorcev soka in pektina v razmerju 50:1 do 20 (± 1) v primeru liofiliziranih vzorcev soka in alginata v razmerju 25:1. Nižji ΔE v primeru liofiliziranih vzorcev soka s polisaharidi kaže na večjo stabilnost barve v primerjavi s prostim liofiliziranim sokom granatnega jabolka (Fischer in sod., 2013).

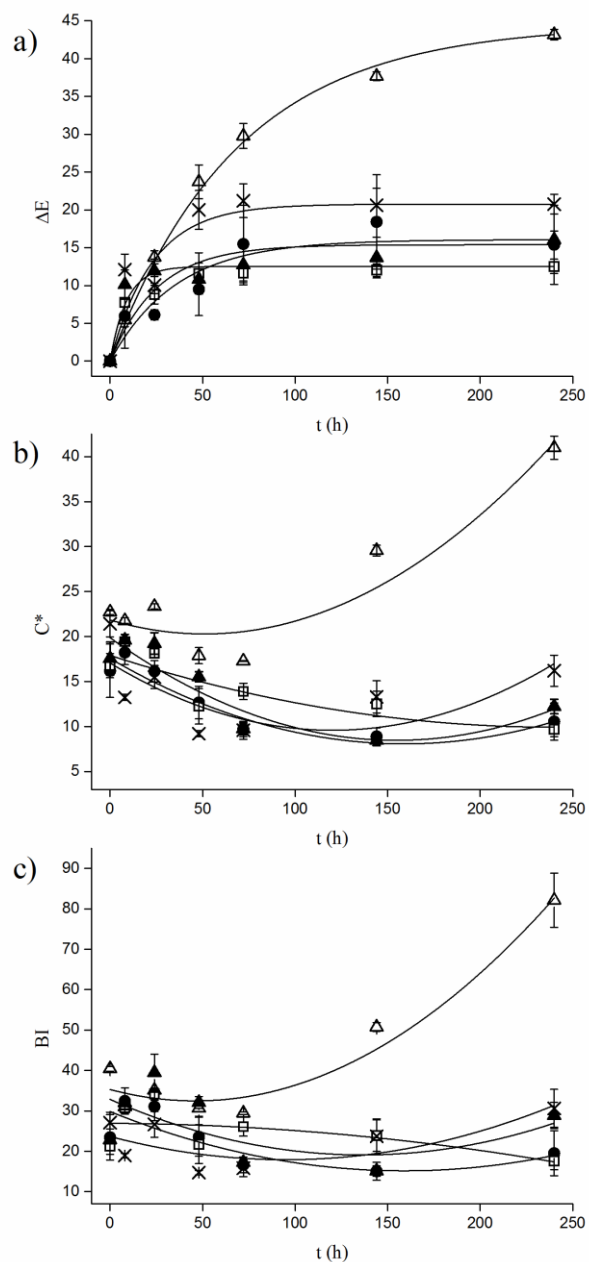
Parameter C^* pomeni nasičenost barve. V vseh primerih je se je vrednost parametra C^* v začetnih časih inkubacije pri 60 °C zniževala, kar se ujema z razgradnjo pigmentov in zmanjšanjem intenzivnosti barve soka oziroma liofiliziranih vzorcev soka s polisaharidi (slika 47b) (Alighourchi in Barzegar, 2009; Oz in Ulukanli, 2012). Po 72 h inkubacije je parameter C^* pri soku začel znatno naraščati, kar lahko sovпада s tvorbo rjavo obarvanih produktov razgradnje antocianinov. Ugotovitev se sklada tudi z indeksom rjave barve, ki je po 72 h inkubacije v primeru soka začel znatno naraščati, medtem ko v primeru liofiliziranih vzorcev soka s polisaharidi ni prišlo do večjih sprememb (slika 47c).

Merjenje parametrov barvnega prostora je pokazalo, da so liofilizirani vzorci soka s polisaharidi manj podvrženi spremembam barve v primerjavi s prostim sokom, vendar so kljub temu podvrženi bledenju tipične rdeče barve soka granatnega jabolka in nastanku rjavo obarvanih produktov. Liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v razmerju 25:1 niso izkazovali boljših lastnosti v primerjavi z ostalimi vzorci, kot se je to pokazalo pri določanju celokupnih antocianinov. Iz tega lahko zaključimo, da omenjeni vzorci nimajo zaščitne vloge pri vzdrževanju površinskih antocianinov, medtem ko antocianine v notranjosti uspešno ščitijo pred povišanimi temperaturami.



Slika 46: Parametri L^* (a), a^* (b) in b^* (c) soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom, inkubiranih pri 60 °C. Δ liofiliziran sok granatnega jabolka, \bullet liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 50:1, \square liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 50:1, \times liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v masnem razmerju 25:1, \blacktriangle liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v masnem razmerju 25:1.

Figure 46: L^* (a), a^* (b) and b^* (c) parameters of pomegranate juice and lyophilized samples of pomegranate juice with alginate or pectin, incubated at 60 °C in dark. Δ lyophilized pomegranate juice, \bullet lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 50:1, \square lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 50:1, \times lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 25:1 and \blacktriangle lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 25:1.



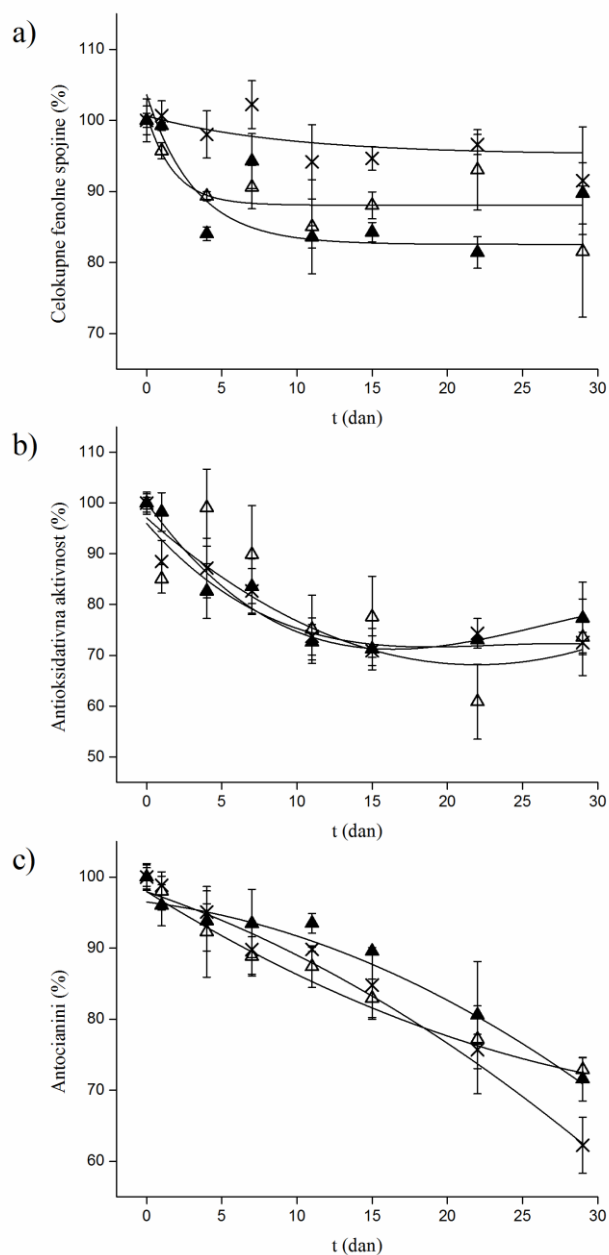
Slika 47: ΔE (a), C^* (b) in BI (c) soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom, inkubiranih pri 60 °C. Δ liofiliziran sok granatnega jabolka, \bullet liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v razmerju 50:1, \square liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v razmerju 50:1, \times liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in alginata v razmerju 25:1, \blacktriangle liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka in pektina v razmerju 25:1.

Figure 47: ΔE (a), C^* (b) and browning index (BI) (c) of pomegranate juice and lyophilized samples of pomegranate juice with alginate or pectin, incubated at 60 °C in dark. Δ lyophilized pomegranate juice, \bullet lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 50:1, \square lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 50:1, \times lyophilized samples of pomegranate juice and alginate in mass ratio 25:1 and \blacktriangle lyophilized samples of pomegranate juice and pectin in mass ratio 25:1.

4.4.7 Stabilnost liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka s polisaharidi v jogurtu

Stabilnost soka granatnega jabolka in liofiliziranih vzorcev soka s polisaharidi v realnem živilu smo preučevali z dodatkom liofiliziranega prostega soka in liofiliziranih vzorcev soka z alginatom ali pektinom v masnem razmerju 25:1 v jogurt. Slika 48 prikazuje vsebnost celokupnih fenolnih spojin, antioksidativno aktivnost ter vsebnost antocianinov v vzorcih jogurta z dodanimi prostim liofiliziranim sokom in liofiliziranimi vzorci soka z alginatom oziroma pektinom. Razvidno je, da vgradnja soka v alginat ali pektin ni imela značilnega vpliva na stabilnost celokupnih fenolnih spojin in antocianinov ter na antioksidativno aktivnost, razen v primeru vzorcev soka z alginatom v razmerju 25:1, kjer je razviden rahel upad vsebnosti antocianinov. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Robert in sod. (2010), ki so sok in etanolni izvleček granatnega jabolka kapsulirali v maltodekstrin ter v izolat sojinih proteinov z metodo sušenja z razprševanjem. Mikrokapsule so dodali v jogurt ter spremljali stabilnost polifenolnih spojin. Razen v enem primeru (etanolni izvleček granatnega jabolka kapsuliran v maltodekstrin) je bila kinetika razgradnje kapsuliranih polifenolnih spojin enaka kinetiki razgradnje prostega soka.

Dodatek soka granatnega jabolka ter liofiliziranih vzorcev soka z alginatom ali pektinom v jogurt je povečal antioksidativno aktivnost jogurta. Kljub temu, da kapsulacija ni doprinesla k večji stabilnosti bioaktivnih komponent soka, smo po 29 dneh inkubacije v jogurtu vseeno določili še najmanj 82 (\pm 9) % začetne vsebnosti celokupnih polifenolnih spojin, 73 (\pm 2) % začetne vrednosti antioksidativne aktivnosti ter 62 (\pm 4) % začetne vsebnosti antocianinov. Vgradnja soka granatnega jabolka v alginat oziroma pektin z metodo liofilizacije omogoča olajšano rokovanje s sokom ter potencialno stabilizacijo sestavin soka med skladiščenjem. V primeru izpostavitve liofiliziranih vzorcev visokim temperaturam je uporaba pektina neprimerna, saj interakcije med sokom in pektinom vodijo do nastanka rjavo obarvanih produktov. Za nadaljnjo uporabo vzorcev v jogurtu so primerni liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka tako z alginatom kot s pektinom, saj nizek pH jogurta ter nizke temperature skladiščenja stabilizirajo antocianine ter preprečijo tvorbo rjavo obarvanih produktov (Wallace in Giusti, 2008; Byamukama in sod., 2014).



Slika 48: Vsebnost celokupnih fenolnih spojin (a), antioksidativna aktivnost (b) ter vsebnost antocijaninov (c) v vzorcih jogurta z dodanimi liofiliziranim sokom granatnega jabolka (Δ), liofiliziranimi vzorci soka in alginata v masnem razmerju 25:1 (\times) ter liofiliziranimi vzorci soka in pektina v masnem razmerju 25:1 (\blacktriangle).

Figure 48: Total polyphenols (a), antioxidant activity (b) and anthocyanins content (c) in yogurt samples with lyophilized pomegranate juice (Δ), lyophilized samples of pomegranate juice with alginate in mass ratio 25:1 (\times) and lyophilized samples of pomegranate juice with pectin in mass ratio 25:1 (\blacktriangle).

4.5 OVREDNOTENJE REZULTATOV GLEDE NA ZASTAVLJENE HIPOTEZE

Hipoteza 1

V sklopu prve hipoteze smo želeli pripraviti polisaharidne delce, ki bi omogočili kapsulacijo katehinov in izvlečkov granatnega jabolka ter bi bili glede na velikost primerni za uporabo v živilih. Z metodo emulzifikacije smo pripravili alginatne delce submikrometrskih velikosti, ki so omogočili 28 % učinkovitost kapsulacije EGCG ter bi bili glede na velikost iz senzoričnega vidika primerni za uporabo v živilih. Na ta način smo potrdili hipotezo 1. Z metodo kapljanja in premreževanja smo pripravili mikrodelce iz alginata ali hitozana, v katere smo kapsulirali (\pm)-katehin in EGCG. Mikrodelci so zaradi svoje porozne strukture sprostili večino jedrnih spojin v raztopino za premreževanje že med samim postopkom kapsulacije. V tem primeru smo hipotezo 1 ovrgli. Raziskave bi bilo smiselno nadaljevati s testiranjem višjih koncentracij premreževalnih sredstev, s čimer bi dosegli boljše zamreženje delcev in s tem manjšo difuzijo jedrnih spojin v okoljsko raztopino.

Hipoteza 2

V sklopu druge hipoteze smo testirali sproščanje jedrnih spojin ter ugotavljali učinkovitost polisaharidnih delcev pri zaščiti jedrnih spojin pred okoljskimi pogoji. V vodnem mediju so mikrodelci iz alginata ali hitozana, pripravljene z metodo kapljanja, in alginatni submikronski delci, pripravljene z metodo emulgiranja, sprostili večino svoje vsebine v zelo kratkih časih inkubacije (30 min) ter tako niso omogočili dolgotrajne zaščite (\pm)-katehina in EGCG, s čimer smo hipotezo 2 ovrgli. Z namenom, da bi dosegli kontrolirano sproščanje jedrnih spojin, smo (\pm)-katehin in EGCG predhodno kapsulirali v liposome ter nato liposome vključili v mikrodelce iz alginata ali hitozana. Na ta način smo dosegli upočasnjeno sproščanje (\pm)-katehina in EGCG iz liposomov oziroma mikrodelcev z vključenimi liposomi v okoljsko raztopino ter zaščitili kapsuliran EGCG pred razgradnjo v raztopinah s pH 2,0 in pH 6,0. Dosežek smo opisali v članku Istenič in sod., 2016.

Hipoteza 3

V sklopu tretje hipoteze smo ugotavljali obstojnost kapsuliranih spojin v izbranem živilu. S kapsulacijo EGCG v liposome in v mikrodelce iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi smo izboljšali stabilnost EGCG v sadnem nektarju ter na ta način potrdili hipotezo 3. Z namenom, da bi stabilizirali sok granatnega jabolka ter dosegli olajšano rokovanje s sokom, smo pripravili liofilizirane vzorce soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata ali pektina. Tako pripravljene vzorce smo dodali v jogurt ter spremljali stabilnost spojin soka. Izkazalo se je, da prisotnost alginata ali pektina ni imela zaščitne vloge pri ohranitvi bioaktivnosti spojin soka, zaradi česar hipoteze 3 v tem primeru nismo mogli potrditi.

Kljub temu, da hipotez v celoti nismo potrdili, smo v raziskavi prišli do pomembnih dognanj. Pokazali smo, da lahko učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG v mikrodelce iz

alginata ali hitozana, izboljšamo s predhodno kapsulacijo spojin v liposome, saj se med katehini, zlasti EGCG, in fosfolipidi dokazano tvorijo močne interakcije. Kapsulacija EGCG v liposome in v polisaharidne mikrodcelce z vključenimi liposomi je zaščitila EGCG pred razgradnjo v raztopinah s pH 2,0 in pH 6,0. Dodatek kapsuliranega EGCG v sadni nektar je omogočal daljšo obstojnost EGCG v primerjavi s prosto spojino, kar dokazuje, da tako liposomi kot mikrodcelci z vključenimi liposomi predstavljajo dobro možnost za stabilizacijo EGCG v živilskih izdelkih. Raziskave bi bilo smiselno usmeriti v nadaljnjo optimizacijo postopkov kapsulacije, s čimer bi lahko pridobili liposome oziroma mikrodcelce z optimalnimi lastnostmi glede velikosti in morfologije, deležem EGCG in profilom sproščanja EGCG v izbranem živilu.

5 SKLEPI

- Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG v mikrodelce iz alginata ali hitozana, pripravljene z metodo kapljanja in premreževanja, je zaradi visoke poroznosti hidrogelov znašala manj kot 1 %. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno testirati uporabo višjih koncentracij premreževalnih sredstev, s čimer bi lahko dosegli boljšo zamreženost delcev in s tem višjo učinkovitost kapsulacije.
- Kapsulacija (\pm)-katehina in EGCG v liposome ter v mikrodelce iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi je zaradi interakcij jedrnih spojin s fosfolipidi omogočila visoko učinkovitost kapsulacije (84-99 %) ter upočasnjeno sproščanje jedrnih spojin v okoljsko raztopino.
- Kapsulacija v liposome ter v mikrodelce iz alginata ali hitozana z vključenimi liposomi je podaljšala kemijsko stabilnost EGCG v primerjavi s prosto spojino pri pH 2,0; pH 6,0 in v sadnem nektarju ter tako predstavlja dobro možnost za stabilizacijo EGCG v živilskih izdelkih.
- Metoda emulgiranja in premreževanja notranje faze je omogočila uspešno pripravo alginatnih delcev submikrometrskih velikosti, ki so kot taki bolj sprejemljivi za rabo v živilskih izdelkih. Centrifugiranje delcev ter spiranje z vodo sta omogočila uspešno ločitev delcev iz oljne faze brez uporabe toksičnih organskih topil.
- Pri uporabi metode emulgiranja in premreževanja notranje faze je postopen in dolgotrajen proces geliranja alginatnih submikronskih delcev omogočil nastanek delcev s homogeno in kompaktno strukturo, ki so ohranili sferično obliko tudi po različnih postopkih sušenja.
- Velika specifična površina submikronskih delcev, pripravljenih z metodo emulzifikacije, je olajšala difuzijo EGCG v oljno fazo že med samim postopkom kapsulacije. Kljub temu je bila učinkovitost kapsulacije EGCG višja (28 %) kot v primeru alginatnih mikrodelcev, pripravljenih z metodo kapljanja (<1 %).
- Priprava liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata ali pektina je omogočila nastanek delcev v obliki prahu, kar je olajšalo rokovanje s sokom granatnega jabolka.
- Liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka z alginatom v masnem razmerju 25:1 so podaljšali stabilnost antocianinov v soku granatnega jabolka pri temperaturi 60 °C,

vendar pri tem niso prispevali k ohranitvi celokupnih fenolnih spojin in antioksidativne aktivnosti.

- Merjenje parametrov barve CIE L*, a* in b* je pokazalo, da so bili liofilizirani vzorci soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata ali pektina pri povišani temperaturi manj podvrženi spremembam barve v primerjavi s prostim sokom. Kljub temu so bili s časom podvrženi bledenju tipične rdeče barve soka granatnega jabolka in nastanku rjavo obarvanih produktov.
- Dodatek liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom v jogurt je povečal funkcionalno vrednost jogurta, vendar prisotnost polisaharidov ni prispevala k večji stabilnosti celokupnih fenolnih spojin in antocianinov ter k ohranitvi antioksidativne aktivnosti soka granatnega jabolka v jogurtu.

6 POVZETEK

Katehini zaradi številnih funkcionalnih lastnosti predstavljajo pomembno skupino flavonoidov. Kot močni antioksidanti in protimikrobna sredstva imajo v živilstvu velik potencial, da nadomestijo sintetične konzervanse in antioksidante (Yilmaz, 2006; Chu in Hsu, 1999; Tang in sod., 2001). Različne fenolne spojine so bogato zastopane tudi v granatnem jabolku; protimikrobno, protihelmintično ter antioksidativno delovanje izvlečkov granatnega jabolka pripisujejo flavonoidom, kot so antocianini ter katehini, in taninom, npr. galni in elagični kislini (Ismail in sod., 2012).

Aktivnost ter potencialni pozitivni učinki polifenolnih spojin so omejeni z njihovo biodostopnostjo in stabilnostjo pri pogojih, ki jih srečamo med procesiranjem živil (temperatura, kisik, pH, svetloba) in v gastrointestinalnem traktu (pH, prisotnost encimov in drugih hranil) (Fang in Bhandari, 2010). Raziskave je tako smiselno usmeriti v razvoj zaščitnih mehanizmov, ki bi omogočili vzdrževanje aktivne molekulske oblike fenolnih spojin. Enega takih mehanizmov predstavlja kapsulacija, ki pomeni proces vkapljanja bioaktivnih snovi v nosilne materiale, ki omogočajo kontrolirano sproščanje jedrne komponente pod specifičnimi pogoji (Desai in Park, 2005). Namen raziskave je bil razvoj različnih kapsulacijskih sistemov za stabilizacijo (\pm)-katehina in EGCG ter soka granatnega jabolka, pri čemer smo se osredotočili na materiale iz vrst naravnih polisaharidov.

(\pm)-katehin in EGCG smo kapsulirali v mikrodolge iz alginata ali hitozana z uporabo mikrokapsulatorja. Zaradi porozne strukture nastalih mikrodolcev je prišlo do difuzije kapsuliranih komponent v utrjevalno raztopino že med samim postopkom kapsulacije. Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG je tako znašala manj kot 1 %. Učinkovitost kapsulacije smo izboljšali tako, da smo (\pm)-katehin in EGCG predhodno kapsulirali v liposome ter šele nato v mikrodolge. Učinkovitost kapsulacije (\pm)-katehina in EGCG v liposome ter v polisaharidne mikrodolge z liposomi je znašala 84 – 99 %.

Sproščanje (\pm)-katehina in EGCG je bilo odvisno od stabilnosti liposomov pri izbranih pogojih ter od interakcij (\pm)-katehina in EGCG s fosfolipidnim dvoslojem. Med alginatom oziroma hitozanom ter fosfolipidnim dvoslojem prihaja do interakcij, ki destabilizirajo liposome (Dhoot in Wheatley, 2003). Posledično je bilo sproščanje (\pm)-katehina iz mikrodolcev z liposomi bolj pospešeno v primerjavi s sproščanjem iz liposomov samih. V primeru EGCG nadaljnje vgrajevanje liposomov v polisaharidne mikrodolge ni povzročilo pospešenega sproščanja. Iz tega smo sklepali, da so bile interakcije med liposomi in EGCG močnejše v primerjavi z interakcijami med liposomi in (\pm)-katehinom. Interakcije med kapsulacijskimi sistemi in EGCG smo podrobneje okarakterizirali z meritvami FTIR in DSC.

Kapsulacija EGCG v liposome ter v polisaharidne mikrodelce z vključenimi liposomi je stabilizirala EGCG v raztopinah s pH 2,0 in pH 6,0 ter v sadnem nektarju, medtem ko v primeru (\pm)-katehina kapsulacija ni imela vpliva na njegovo stabilnost.

Alginatni mikrodelci, pripravljene z mikrokapsulatorjem, so bili veliki $320 (\pm 10) \mu\text{m}$, mikrodelci iz hitozana pa $350 (\pm 20) \mu\text{m}$. Z namenom, da bi pripravili manjše delce, ki bi bili v živilskih izdelkih bolj sprejemljivi, smo uporabili metodo emulzifikacije. Raztopino alginata smo emulgirali v oljni fazi ter ločeno pripravili nanodelce CaCl_2 v olju. Emulziji alginata in nanodelcev CaCl_2 smo združili ter z inkubacijo preko noči omogočili, da so se nanodelci CaCl_2 adsorbirali na površino alginatnih kapljic ter s tem povzročili geliranje alginata in nastanek delcev.

S SEM smo pokazali prisotnost delcev, velikih $370 (\pm 25) \text{nm}$. V alginatne submikronske delce smo kapsulirali EGCG ter dosegli učinkovitost kapsulacije 28 %. Podaljšan čas geliranja alginatnih submikronskih delcev je omogočil nastanek homogenih in kompaktnih struktur ter pripomogel k bolj učinkoviti kapsulaciji v primerjavi z učinkovitostjo kapsulacije v alginatne delce, pripravljene z mikrokapsulatorjem ($< 1 \%$).

Sok granatnega jabolka smo vgradili v različne polisaharide (alginat, pektin, pululan in hitozan) z metodo liofilizacije. Pri kapsulaciji soka v alginat ali pektin v masnih razmerjih 50:1 in 25:1 smo dobili lepljiv prah oziroma prah, kar je omogočilo olajšano rokovanje s sokom in nadaljnjo karakterizacijo. Učinkovitost kapsulacije je znašala od 59 % do 76 %. Liofilizirane vzorce soka granatnega jabolka z alginatom oziroma pektinom smo inkubirali pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in spremljali vsebnost celokupnih polifenolnih spojin, antioksidativno aktivnost, vsebnost antocianinov ter barvo vzorcev v odvisnosti od časa. Rezultati so pokazali, da so liofilizirani vzorci soka in alginata v masnem razmerju 25:1 pripomogli k ohranitvi vsebnosti antocianinov pri povišani temperaturi. Nasprotno je prisotnost pektina povzročila nastanek rjavo obarvanih produktov, ki pa so izkazovali antioksidativno aktivnost in povzročili obarvanje reagenta Folin-Ciocalteau.

Prisotnost polisaharidov v nobenem primeru ni imela zaščitne vloge pri ohranjanju celokupnih fenolnih spojin in antioksidativne aktivnosti. Merjenje parametrov barvnega prostora je pokazalo, da so bili liofilizirani vzorci soka s polisaharidi manj podvrženi spremembam barve v primerjavi s prostim sokom, vendar so bili kljub temu podvrženi bledenju tipične rdeče barve soka granatnega jabolka in nastanku rjavo obarvanih produktov. Dodatek liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka z alginatom ali pektinom v jogurt je povečal antioksidativno aktivnost jogurta. Kljub temu se je izkazalo, da ob dodatku liofiliziranih vzorcev v jogurt kapsulacija ni doprinesla k boljši stabilnosti bioaktivnih spojin v primerjavi z nekapsuliranim sokom.

Mikrokapsulacija se je izkazala kot učinkovit način za stabilizacijo EGCG in soka granatnega jabolka. Zlasti zanimiv sistem kapsulacije so predstavljali liposomi in mikrodelci z vključenimi liposomi, ki so omogočali upočasnjeno sproščanje EGCG v okoljsko raztopino in zaščito EGCG pred pH 2,0, pH 6,0 in sestavinami sadnega nektarja. EGCG dokazano že v zelo nizkih koncentracijah zavira rast nekaterih bakterijskih vrst in smiselno bi bilo ovrednotiti vpliv postopnega sproščanja EGCG iz kapsulacijskih sistemov na rast mikroorganizmov v živilu, s čimer bi pridobili vpogled v možnosti uporabe kapsuliranega EGCG kot nadomestka sintetičnih konzervansov. S pripravo alginatnih delcev z metodo emulzifikacije smo pokazali, da je možno z uporabo zgolj naravnih sestavin, ki imajo dovoljenje za rabo v živilih, pridobiti sferične delce submikrometrskih velikosti, ki po različnih postopkih sušenja obdržijo svojo obliko. Priprava liofiliziranih vzorcev soka granatnega jabolka v prisotnosti alginata je olajšala rokovanje s sokom in prispevala k ohranitvi celokupnih antocianinov pri 60 °C. Nadaljnja optimizacija priprave liofiliziranih vzorcev (npr. priprava izvlečkov granatnega jabolka, uporaba še nižjega razmerja med izvlečki in polisaharidi) bi doprinesla k večji možnosti uporabe antocianinov kot naravnih barvil v živilih.

7 SUMMARY

Catechins represent an important group of flavonoids in green tea as they possess numerous functional properties. Due to their antioxidant and antimicrobial properties catechins have great potential to replace artificial preservatives and antioxidants in food products (Yilmaz, 2006; Chu and Hsu, 1999; Tang et al., 2001). Different phenolic compounds are well represented also in pomegranate; antimicrobial, antihelmintic and antioxidant properties of pomegranate extracts are attributed to flavonoids (anthocyanins and catechins) and tannins (gallic and ellagic acid) (Ismail et al., 2012).

Activity and the potential benefits of polyphenols are limited by their bioavailability and stability under the conditions during food processing and storage (temperature, oxygen, pH, light) and in gastrointestinal tract (pH, enzymes, other nutrients) (Fang and Bhandari, 2010). Studies should be oriented towards the development of protection mechanisms that would enhance the stability of bioactive compounds. One of such mechanisms is encapsulation of bioactive compounds into different carrier materials, which allow controlled release of the core material under specific conditions (Desai and Park, 2005). The purpose of this research was to develop different encapsulation systems based on natural polysaccharides as carrier materials in order to protect catechins and pomegranate extracts against adverse environmental conditions.

(±)-catechin and EGCG were encapsulated into alginate and chitosan microparticles using microencapsulator. Due to the porous structure of the microparticles the core compounds diffused out of the microparticles already during the encapsulation process. Therefore, the encapsulation efficiency of (±)-catechin and EGCG was less than 1%. By encapsulating (±)-catechin and EGCG into liposomes prior the encapsulation into alginate or chitosan microparticles the encapsulation efficiency was improved to 84.0-98.7%.

The release rate of the core compounds was governed by liposome stability and the nature of (±)-catechin and EGCG interactions with liposomes. Interactions of alginate and chitosan with phospholipid bilayer lead to destabilization of the liposomes (Dhoot and Wheatley, 2003). Consequently, (±)-catechin release from microparticles reinforced with liposomes was accelerated in comparison to the (±)-catechin release from liposomes alone. In case of EGCG, further encapsulation of liposomes into the polysaccharide microparticles did not accelerate the EGCG release. The results suggested that the interactions between EGCG and liposomes were stronger than interaction between (±)-catechin and liposomes. The interactions between the encapsulation systems and EGCG were further evaluated by FTIR and DSC measurements.

Encapsulation into liposomes and into polysaccharide microparticles reinforced with liposomes protected EGCG against adverse environmental conditions (solutions with pH 2.0 and 6.0, fruit nectar) while in case of (\pm)-catechin the encapsulation did not enhance its stability.

The diameter of the microparticles, prepared by microencapsulator, was 320 (\pm 10) μm for alginate microparticles and 350 (\pm 20) μm for chitosan microparticles. In order to prepare smaller particles that would be more appropriate for food industry from the sensorial point of view, we used emulsification method followed by external gelation. Alginate-in-oil emulsion and CaCl_2 nanoparticles in oil were prepared separately. The two emulsions were combined and stirred overnight to allow CaCl_2 nanoparticles to be absorbed on the surface of alginate droplets and, in turn, cause the gelation of alginate droplets into particles.

SEM confirmed the presence of alginate particles with diameter of 370 (\pm 25) nm. Using the emulsification method, we encapsulated EGCG with encapsulation efficiency of 28%. The prolonged stirring time needed for gelation of alginate droplets enabled the formation of particles with homogenous and compact structure. Consequently, the encapsulation efficiency of EGCG into alginate submicron particles was significantly higher in comparison to the encapsulation efficiency into alginate microparticles prepared by extrusion method (< 1%).

Pomegranate juice was encapsulated into different polysaccharide matrices (alginate, pectin, chitosan, pullulan) using lyophilization method. Encapsulation of pomegranate juice into alginate or pectin in mass ratios of 50:1 and 25:1 enabled the formation of powders, which facilitated the pomegranate juice handling and enabled further characterization. The encapsulation efficiency ranged from 59% to 76%. The lyophilized pomegranate juice and the lyophilized samples with alginate or pectin were incubated at 60 °C and at defined time points total phenolics, antioxidant activity and total anthocyanin content were determined. The results showed that alginate promoted the anthocyanin stability while pectin promoted the formation of brown products, which exhibited antioxidant activity and caused positive reaction in the presence of the Folic-Ciocalteau reagent.

The presence of polysaccharides had no positive effect on stability of total phenolic compounds and antioxidant activity. Measuring the parameters of the colour space showed that the lyophilized samples of pomegranate juice with alginate or pectin were less prone to colour change in comparison to free lyophilized juice, however they still exhibited fading of the typical pomegranate red colour and formation of brown products. The addition of the lyophilized samples to yogurt increased the functional properties of yogurt, but the encapsulation did not promote the stability of bioactive compounds in comparison to non-encapsulated pomegranate juice.

In the present study we have shown that microencapsulation is an effective tool for stabilization of EGCG and pomegranate juice. Two of the most interesting encapsulation systems were comprised of liposomes and microparticles reinforced with liposomes, which enabled slow release of EGCG into the aqueous solution and protected EGCG against degradation at pH 2.0, pH 6.0 and in fruit nectar. EGCG has antimicrobial properties already at very low concentrations and it would be very interesting to evaluate the effect of the gradual EGCG release from the encapsulation systems on bacterial growth in food products. This evaluation would provide important information on EGCG as a substitute for artificial preservatives in food. With the emulsification method we have been able to prepare alginate particles of submicrometer sizes using only food grade materials. The particles retained their spherical shape even after different drying processes, which was one of the best results of this part of the study. Microencapsulation of pomegranate juice into alginate matrix facilitated the handling of the compound and protected anthocyanins against degradation at 60 °C. Further optimization of the encapsulation process (e.g.: preparation of pomegranate extracts, utilization of lower ratio between extract and polysaccharide) would be a prominent way to promote the use of anthocyanins as natural colorants in food industry.

8 VIRI

- Abram V., Berlec B., Ota A., Šentjunc M., Blatnik P., Poklar Ulrih N. 2013. Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. *Food Chemistry*, 139, 1-4: 804-813
- Ahmed S. T., Manirul Islam M., Rubayet Bostami A. B. M., Mun H.-S., Kim Y.-J., Yang C.-J. 2015. Meat composition, fatty acid profile and oxidative stability of meat from broilers supplemented with pomegranate (*Punica granatum* L.) by-products. *Food Chemistry*, 188: 481-488
- Alighourchi H., Barzegar M. 2009. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90, 2: 179-185
- Ananingsih V. K., Sharma A., Zhou W. 2013. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, 50, 2: 469-479
- Andary J., Maalouly J., Ouaini R., Chebib H., Beyrouthy M., Rutledge D. N., Ouaini N. 2013. Phenolic compounds from diluted acid hydrolysates of olive stones: Effect of overliming. *Advances in Crop Science and Technology*, 1: 103, doi: 10.4172/2329-8863.1000103: 7 str.
- Appelquist I. A. M., Golding M., Vreeker R., Zuidam N. J. 2007. Emulsions as delivery systems in foods. V: Encapsulation and controlled release technologies in food systems. Lakkis J. M. (ed.). Ames, Blackwell Publishing: 41-82
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 99: 191-203
- Bansal S., Choudhary S., Sharma M., Kumar S. S., Lohan S., Bhardwaj V., Syan N., Jyoti S. 2013. Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research International*, 53: 568-584
- Belščak-Cvitanović A., Stojanović R., Manojlović V., Komes D., Cindrić I. J., Nedović V., Bugarski B. 2011. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44, 4: 1094-1101
- Berens A. R., Hopfenberg H. B. 1978. Diffusion and relaxation in glassy polymer powders: 2. Separation of diffusion and relaxation parameters. *Polymer*, 19, 5: 489-496
- Blandino A., Macias M., Cantero D. 2000. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 3-5: 319-324
- Bligh E. G., Dyer W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 8: 911-917
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 1: 25-30

- Byamukama R., Andima M., Mbabazi A., Kiremire B. T. 2014. Anthocyanins from mulberry (*Morus rubra*) fruits as potential colour additives in yoghurt. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 8, 12: 182-190
- Çam M., Cihat N., Icyer C., Erdogan F. 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT – Food Science and Technology*, 55, 1: 117-123
- Çam M., Hışıl Y., Durmaz G. 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112, 3: 721-726
- Chan L. W., Lee H. Y., Heng P. W. S. 2006. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63, 2: 176–187
- Chen Z. Y., Chan P. T. 1996. Antioxidative activity of green tea catechins in canola oil. *Chemistry and Physics of Lipids*, 82, 2: 163–172
- Chen Z., Zhu Q. Y., Tsang D., Huang Y. 2001. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1: 477-482
- Cheng K., Demirci A., Catchmark J. M. 2011. Pullulan : biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 1: 29–44
- Cho A. R., Chun Y. G., Kim B. K., Park D. J. 2014. Preparation of alginate–CaCl₂ microspheres as resveratrol carriers. *Journal of Materials Science*, 49, 13: 4612–4619
- Choi M. H., Kim G. H., Lee H. S. 2002. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35, 8: 753-759
- Chu Y., Hsu H. 1999. Effects of antioxidants on peanut oil stability. *Food Chemistry*, 66, 1: 29-34
- Cilek B., Luca A., Hasirci V., Sahin S., Sumnu G. 2012. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235, 4: 587-596
- Coisson J. D., Travaglia F., Piana G., Capasso M., Arlorio M. 2005. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. *Food Research International*, 38: 893-897
- Connor J., Yatvin M. B., Huang L. 1984. pH-sensitive liposomes: Acid-induced liposome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 6: 1715-1718
- de Vos P., Faas M. M., Spasojevic M., Sikkema J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 4: 292–302
- Desai K. G. H., Jin Park H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology: An International Journal*, 23, 7: 1361-1394

- Dhoot N. O., Wheatley M. A. 2003. Microencapsulated liposomes in controlled drug delivery: Strategies to modulate drug release and eliminate the burst effect. *Journal of Pharmaceutical Science*, 92, 3: 679-689
- Dolenc A., Kristl J. 2008. Razvoj polielektrolitne nanoobloge na mikrodelcih učinkovine. *Farmacevtski vestnik*, 59: 273-277
- Draget K. I., Moe S. T., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O. 2006. Alginates. V: *Food polysaccharides and their applications*. Stephen A. M., Phillips G. O., Williams P. A. (eds.). 2nd ed. New York, Taylor & Francis Group: 289 – 334
- Dubick M. A., Omaye S. T. 2007. Grape wine and tea polyphenols in the modulation of atherosclerosis and heart disease. V: *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Wildman R. E. C. (ed.). 2nd ed. New York, Taylor & Francis Group: 101 – 130
- Encapsulator B-390/B-395 Pro Technical data sheet. 2015. Flawil, Büchi Labortechnik AG: 7 str.
http://static1.buchi.com/sites/default/files/technical-data-pdf/B-390_B-395Pro_Data_Sheet_en_B.pdf?9924bc874b326970aad6cbf9bc63f1e0b7b42b4a
(15.okt. 2015)
- Fang Z., Bhandari B. 2010. Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 10: 510–523
- Ferrari G., Maresca P., Ciccarone R. 2010. The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100, 2: 245-253
- Fischer U. A., Carle R., Kammerer D. R. 2013. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chemistry*, 138, 2-3: 1800-1809
- Flores S., Conte A., Campos C., Gerschenson L., Del Nobile M. 2007. Mass transport properties of tapioca-based active edible films. *Journal of Food Engineering*, 81, 3: 580-586
- FMC BioPolymer. 2003. Alginates. Philadelphia, FMC Cooperation: 14 str.
<http://www.fmcbiopolymer.com/portals/pharm/content/docs/alginates.pdf> (10. jan. 2016)
- Gadkari P. V., Balaraman M. 2014. Catechins: Sources, extraction and encapsulation. *Food and Bioproducts Processing*, 93: 122-138
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 9: 1107–1121
- Gibbs B. F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C. N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 3: 213–224
- Gibis M., Rahn N., Weiss J. 2013. Physical and oxidative stability of uncoated and chitosan-coated liposomes containing grape seed extract. *Pharmaceutics*, 5, 3: 421-433

- Gierszewska-Drużyńska M., Ostrowska-Czubensko J. 2010. The effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 15: 25-32
- Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M., Kader A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 10: 4581-4589
- Giusti M. M., Wrolstad R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. V: *Current protocols in food analytical chemistry*. Wrolstad R. E., Acree T. E., An H., Decker E. A., Penner M. H., Reid D. S., Schwartz S. J., Shoemaker C. F., Sporns P. (eds.). New York, John Wiley & Sons: F1, 2.1 – F1, 2.13
- Gómez-Mascaraque L. G., Lagarón J. M., López-Rubio A. 2015. Electrospayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. *Food Hydrocolloids*, 49: 42-52
- Gonzalez-Rodriguez M. L., Holgado M. A., Sanchez-Lafuente C., Rabasco A. M., Fini A. 2002. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 1-2: 225-234
- Gosh S. K. 2006. Functional coatings and microencapsulation: A general perspective. V: *Functional coatings: by polymer microencapsulation*. Gosh S.K. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1-28
- Gouin S. 2004. Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 7-8: 330-347
- Goula A. M., Adamopoulos K. G. 2012. A method for pomegranate seed application in food industries : Seed oil encapsulation. *Food Bioproducts Processing*, 90, 4: 639–652
- Govender T., Stolnik S., Garnett M. C., Illum L., Davis S. S. 1999. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57, 2: 171-185
- Guerrero S., Alzamora S.M., Gerschenson L. N. 1996. Optimization of a combined factors technology for preserving banana purée to minimize colour changes using the response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 28, 3-4: 307-322
- Guignon B., Duquenoy A., Dumoulin E. D. 2007. Fluid bed encapsulation of particles: principles and practice. *Drying Technology: An International Journal*, 20, 2: 419-447
- Hedges A. R. 1998. Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 5: 2035-2044
- Higdon J. V., Frei B. 2010. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism , and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 1: 89-143
- Hong J., Lu H., Meng X., Ryu J.-H., Hara Y., Yang C. S. 2002. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, 62: 7241-7246

- Hunt I. 2016. Chapter 13: Spectroscopy: Infra-red (IR) spectroscopy. Calgary, University of Calgary: 2 str.
<http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-ir-1.html> (21. jan. 2016)
- Igathinathane C., Pordesimo L. O., Columbus E. P., Batchelor W. D., Methuki S. R. 2008. Shape identification and particles size distribution from basic shape parameters using ImageJ. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63, 2: 168–182
- Isailović B. D., Kostić I. T., Zvonar A., Đorđević V. B., Gašperlin M., Nedović V. A., Bugarski B. M. 2013. Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19: 181-189
- Ismail T., Sestili P., Akhtar S. 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 2: 397–405
- Istenič K., Balanč B. D., Djordjević V. B., Bele M., Nedović V. A., Bugarski B. M., Poklar Ulrih N. 2015. Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles. *Journal of Food Engineering*, 167: 196-203
- Jaiswal V., DerMarderosian A., Porter J. R. 2010. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry*, 118, 1: 11–16
- Kalamara E., Goula A. M., Adamopoulos K. G. 2014. An integrated process for utilization of pomegranate wastes – Seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27: 144-153
- Kestin J., Sokolov M., Wakeham W. A. 1978. Viscosity of liquid water in the range -8 °C to 150 °C. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 7, 3: 941-948
- Krishnan S., Kshirsagar A. C., Singhal R. S. 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62: 309-315
- Krüss. 2015. Wilhelmy plate method. Hamburg, Krüss GmbH: 2 str.
<http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/wilhelmy-plate-method/> (5. dec. 2015)
- Lawrie G., Keen I., Drew B., Chandler-Temple A., Rintoul L., Fredericks P., Grøndahl L. 2007. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8: 2533-2541
- Leathers T. D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 5: 468–473
- Lee J., Durst R. W., Wrolstad R. E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 5: 1269-1278

- Lee J.-S., Chung D., Lee H. G. 2008. Preparation and characterization of calcium pectinat gel beads entrapping catechin-loaded liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42: 178-184.
- Lee K. Y., Mooney D. Y. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 1: 106-126
- Li N., Taylor L. S., Ferruzzi M. G., Mauer L. J. 2012. Kinetic study of catechin stability: Effects of pH, concentration, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 51: 12531-12539
- Li P., Dai Y.-N., Zhang J.-P., Wang A.-Q., Wei Q. 2008a. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 3: 221-228
- Li X. Y., Kong X. Y., Shi S., Zheng X. L., Gui G., Wei Y. Q., Qian Z. Y. 2008b. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnology*, 8: 89, doi: 10.1186/1472-6750-8-89: 11 str.
- Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96: 254-260
- Lide D. R. (ed.). 2004. *Handbook of chemistry and physics*. 84th ed. Boca Raton, CRC Press LCC: 4-94
- Lopez-Cordoba A., Deladino L., Martino M. 2014. Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. *Carbohydrate Polymers*, 99: 150–157
- Luca A., Cilek B., Hasirci V., Sahin S., Sumnu G. 2013. Effect of degripping of phenolic extract from sour cherry pomace on encapsulation efficiency – production of nano-suspension. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 2494-2502
- Luo Y., Zhang B., Cheng W.-H., Wang Q. 2010. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrate Polymers*, 82, 3: 942-951
- Mady M. M., Elshemey W. M. 2011. Interaction of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) liposomes and insulin. *Molecular Physics*, 109, 12: 1593-1598
- Madziva H., Kailasapathy K., Phillips M. 2006. Evaluation of alginate–pectin capsules in cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT – Food Science and Technology*, 39, 2: 146–151
- Mahajan D., Bhat Z. F., Kumar S. 2015. Pomegranate (*Punica granatum*) rind extract as a novel preservative in cheese. *Food Bioscience*, 12: 47–53
- Makraduli L., Crcarevska M. S., Geskovski N., Dodov M. G., Goracinova K. 2013. Factorial design analysis and optimisation of alginate-Ca-chitosan microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 30, 1: 81–92
- Manach C. 2004. Polyphenols : food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 5: 727-747

- Mastrodi Salgado J., Baroni Ferreira T. R., de Oliveira Biazotto F., dos Santos Dias C. T. 2012. Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica granatum*) peel. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 1: 39–43
- Mathlouthi M., Génotelle J. 1995. Rheological properties of sucrose solutions and suspensions. V: *Sucrose: properties and applications*. Mathlouthi M., Reiser Cedus P. (eds.). Dordrecht, Springer Science + Business Media B.V.: 126-154
- Mazzitelli S., Tosi A., Balestra C., Nastruzzi C., Luca G., Mancuso F., Calafiore R., Calvitti M. 2008. Production and characterization of alginate microcapsules produced by a vibrational encapsulation device. *Journal of Biomaterials Applications*, 23, 2: 123-145
- McClements D. J. 2015. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219: 27-53.
- Mohammadi M., Ghanbarzadeh B., Hamishehkar H. 2014. Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4, 2: 569-575
- Monshipouri M., Rudolph A. S. 1995. Liposome-encapsulated alginate: controlled hydrogel particle formation and release. *Journal of Microencapsulation*, 12, 2: 117–127
- Mousavinejad G., Emam-Djomeh Z., Rezaei K., Khodaparast M. H. H. 2009. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*, 115: 1274–1278
- Murawska M., Wiatr M., Nowakowski P., Szutkowski K., Skrzypczak A., Kozak M. 2013. The structure and morphology of gold nanoparticles produced in cationic gemini surfactant systems. *Radiation Physics and Chemistry*, 93: 160–167
- Murray J. C. F. 2009. Cellulosics. V: *Handbook of hydrocolloids*. Phillips G. O., Williams P. A. (eds.). 2nd ed. Cambridge, Woodhead Publishing: 710-723
- Nwuha V., Nakajima M., Tong J., Ichikawa S. 1999. Solubility study of green tea extracts in pure solvents and edible oils. *Journal of Food Engineering*, 40: 161-165
- Okuro P. K., de Matos Junior F. E., Favaro-Trindade C. S. 2013. Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 2: 171-182
- Oliveira A. M., Guimarães K. L., Cerize N. N. P., Tunussi A. S., Poço J. G. R. 2013. Nano spray drying as a innovative technology for encapsulating hydrophobic active pharmaceutical ingredients. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 4: 186, doi: 10.4172/2157-7439.1000186: 6 str.
- Opitz S. E. W., Smrke S., Goodman B. A., Keller M., Schenker S., Yeretian C. 2014. Antioxidant generation during coffee roasting: A comparison and interpretation from three complementary assays. *Foods*, 3: 586-604
- Oz A. T., Ulukanli Z. 2012. Application of edible starch-based coating including glycerol plus oleum nigella on arils from long-stored whole pomegranate fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36: 81-95

- Paques J. P., Sagis L. M. C., van Rijn C. J. M., van der Linden E. 2014a. Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO₃. *Food Hydrocolloids*, 40: 182–188
- Paques J. P., van der Linden E., Sagis L. M. C., van Rijn C. J. M. 2012. Food-grade submicrometer particles from salts prepared using ethanol-in-oil mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 34: 8501–8509
- Paques J. P., van der Linden E., van Rijn C. J. M., Sagis L. M. C. 2013. Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl₂ nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 31, 2: 428–434
- Paques J. P., van der Linden E., van Rijn C. J. M., Sagis L. M. C. 2014b. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209: 163–171
- Pereira G. M., Kothe C. I., Machado C. C., Lopes S. M., Flôres S. H., Rios A. O. 2014. Effect of modified atmosphere applied to minimally processed radicchio (*Cichorium intybus* L.) submitted to different sanitizing treatments. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34, 3: 513-521
- Perrett S., Golding M., Williams P. 1991. A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43: 154-161
- Perumalla A. V. S., Hettiarachchy N.S. 2011. Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44: 827–839
- Pinheiro A. C., Bourbon A. I., Cerqueira M. A., Maricato E., Nunes C., Coimbra M. A., Vicente A. A. 2015. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 115: 1–9
- Pinheiro A. C., Bourbon A. I., Quintas M. A. C., Coimbra M. A., Vicente A. A. 2012. K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16: 227–232
- Prüße U., Bruske F., Breford J., Vorlop K.-D. 1998. Improvement of the jet cutting method for the preparation of spherical particles from viscous polymer solutions. *Chemical Engineering & Technology*, 21, 2: 153–157
- Ramkumar P., Janakiraman K., Sivaraman G., Senthilnathan K., Meganathan V., Saravanan P. 2015. Formulation and characterization of epigallocatechin gallate nanoparticles. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 1: 387-399
- Rapeanu G., van Loey A., Smout C., Hendrickx M. 2006. Thermal and high pressure inactivation kinetics of victoria grape polyphenol oxidase: From model system to grape must. *Journal of Food Processing Engineering*, 29: 269 – 286
- Rashidinejad A., Birch E. J., Sun-Waterhouse D., Everett D. W. 2014. Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated in low-fat hard cheese. *Food Chemistry*, 156: 176-183

- Reis C. P., Ribeiro A. J., Houngh S., Veiga F., Neufeld R. J. 2007. Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and *in vitro/in vivo* bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 5: 392–397
- Ribeiro H. S., Schuchmann H. P., Engel R., Walz E., Briviba K. 2010. Encapsulation of carotenoids. V: *Encapsulation technologies for active food ingredients*. Zuidam N. J., Nedović V. A. (eds.). New York, Springer: 211-252.
- Robert P., Gorena T., Romero N., Sepulveda E., Chavez J., Saenz C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 7: 1386–1394
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. *Fizikalnokemijske metode v živilstvu*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 376 str.
- Saénez C., Tapia S., Chávez J., Robert P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114: 616-622
- Sang S., Lee M. J., Hou Z., Ho C.T., Yang C. S. 2005. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 24: 9478–9484
- Sanna V., Lubinu G., Madau P., Pala N., Nurra S., Mariani A., Sechi M. 2015. Polymeric nanoparticles encapsulating white tea extract for nutraceutical application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7: 2026-2032
- Sanna V., Siddiqui I. A., Sechi M., Mukhtar H. 2013. Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 10: 3871-3881
- Scalia S., Marchetti N., Bianchi A. 2013. Comparative evaluation of different antioxidants on the photochemical- and functional-stability of epigallocatechin-3-gallate in topical creams exposed to simulated sunlight. *Molecules*, 18: 574-587
- Seeram N. P., Aviram M., Zhang Y., Henning S. M., Feng L., Dreher M., Heber D. 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4: 1415-1422
- Sharma S., Parmar A., Kori S., Sandhir R. 2016. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 80: 30-40.
- Shilpa A., Agrawal S. S., Ray A. R. 2003. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 43, 2: 187-221
- Shipp J., Abdel-Aal E. 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *Open Food Science Journal*, 4, 1: 7-22

- Shpigelman A., Cohen Y., Livney Y. D. 2012. Thermally-induced β -lactoglobulin-EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study. *Food Hydrocolloids*, 29, 1: 57–67
- Singh R. S., Saini G. K., Kennedy J. F. 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73, 4: 515–531
- Singleton V. L., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 3: 144-158
- Slatinek A. 2015. Mikrokapsuliranje ekstrakta granatnega jabolka (*Punica granatum* L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 68 str.
- Soni M. L., Kumar M., Namdeo K. P. 2010. Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and *in vitro* evaluation. *International Journal of Drug Delivery*, 2, 1: 64-68
- Sosnik A. 2014. Alginate particles as platform for drug delivery by oral route: State of the art. *ISRN Pharmaceutics*, 2014: ID 926157, doi: org/10.1155/2014/926157: 17 str.
- Stojanović R., Belščak-Cvitanović A., Manojlović V., Komes D., Nedović V., Bugarski B. 2012. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 3: 685-696
- Su Y. L., Leung L. K., Huang Y., Chen Z.-Y. 2003. Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry*, 83, 2: 189-195
- Taggart P., Mitchell J. R. 2009. Starch. V: Handbook of hydrocolloids. Phillips G. O., Williams P. A. (eds.). 2nd ed. Cambridge, Woodhead Publishing: 108-141
- Takagi I., Shimizu H., Yotsuyanagi T. 1996. Application of alginate gel as a vehicle for liposomes. I. Factors affecting the loading of drug-containing liposomes and drug release. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44, 10: 1941-1947
- Tang D.-W., Yu S.-H., Ho Y.-C., Huang B.-Q., Tsai G.-J., Hsieh H.-Y., Sung H.-W., Mi F.-L. 2013. Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and edible polypeptide. *Food Hydrocolloids*, 30, 1: 33-41
- Tang S., Kerry J. P., Sheehan D., Buckley D. J., Morrissey P. A. 2001. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*, 34, 8: 651–657
- Tehraniifar A., Zarei M., Nemati Z., Esfandiyari B., Vazifeshenas M. R. 2010. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126: 180-185
- Teixeira da Silva J. A., Rana T. S., Narzary D., Verma N., Meshram D. T., Ranade S. A. 2013. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*, 160: 85–107
- Terpinc P. 2006. Arheje in antioksidanti. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 80 str.

- Tezcan F., Gültekin-Özgülven M., Diken T., Özçelik B., Erim F. B. 2009. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115, 3: 873-877
- Thilakarathna S., Rupasinghe H. 2013. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients* 5, 9: 3367–3387
- Trigueros L., Wojdylo A., Sendra E. 2014. Antioxidant activity and interactions protein-polyphenol in a pomegranate (*Punica granatum* L.) yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 27: 6417-6425
- Türkyılmaz M. 2013. Anthocyanin and organic acid profiles of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from registered varieties in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 10: 2086-2095
- Uekusa Y., Kamihira M., Nakayama T. 2007. Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes as determined by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9986-9992
- Uekusa Y., Kamihira-Ishijima M., Sugimoto O., Ishii T., Kumazawa S., Nakamura K., Tanji K., Naito A., Nakayama T. 2011. Interaction of epicatechin gallate with phospholipid membranes as revealed by solid state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808: 1654-1660
- USDA. 2015. USDA National nutrient database for standard reference: Release 28: Basic report: 09286, Pomegranates, raw. Washington DC, United States Department of Agriculture: 2 str.
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2359?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=pomegranate> (21. feb. 2016)
- Valcic S., Muders A., Jacobsen N. E., Liebler D. C., Timmermann B. N. 1999. Antioxidant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-epidallocatechin gallate with peroxy radicals. *Chemical Research in Toxicology*, 12: 382-386
- Vardin H., Fenercioğlu H. 2003. Study on the development of pomegranate juice processing technology: clarification of pomegranate juice. *Nahrung*, 47: 300-303
- Vardin H., Yasar M. 2012. Optimisation of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 1: 167-176
- Vårum K. M., Smidsrød O. 2006. Chitosans. V: Food polysaccharides and their applications. Stephen A. M., Phillips G. O., Williams P. A. (eds.). 2nd ed. New York, Taylor & Francis Group: 497 – 520
- Viuda-Martos M., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. A. 2010. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 6: 635-654
- Wallace T. C., Giusti M. M. Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Beberis boliviana* L. as

- compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science*, 73, 4: C241-C248
- Wandrey C., Bartkowiak A., Harding S. E. 2010. Materials for encapsulation. V: Encapsulation technologies for active food ingredients. Zuidam N. J., Nedović V. A. (eds.). New York, Springer: 31-100
- Wang H.-Y., Qian H., Yao W.-R. 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128: 573-584
- Wang R., Zhou W., Jiang X. 2008. Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8: 2694–2701
- Weerawatanakorn M., Huang Q., Ho C.-T. 2014. Monitoring the binding processes of (-)-epigallocatechin gallate and theaflavin-3,3'-digallate to alpha-casein surface using quartz crystal microbalance with dissipation. *International Food Research Journal*, 21, 2: 493–499
- Whelehan M., Marison I. W. 2011. Microencapsulation using vibrating technology. *Journal of Microencapsulation*, 28, 8: 669-688
- Wrolstad R. E., Durst R. W., Lee J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 9: 423-428
- Yilmaz Y. 2006. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 2: 64-71
- Yoda Y., Hu Z.-Q., Zhao W.-H., Shimamura T. 2004. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10, 1: 55–58
- You J.-O., Peng C.-A. 2005. Calcium-alginate nanoparticles formed by reverse microemulsion as gene carriers. *Macromolecular Symposia*, 219, 1: 147–153
- Zam W., Bashour G., Abdelwahed W., Khayata W. 2014. Alginate-pomegranate peels' polyphenols beads: effects of formulation parameters on loading efficiency. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 4: 741-748
- Zaveri N. T. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins : Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*, 78, 18: 2073–2080
- Zhang H., Jung J., Zhao Y. 2016. Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catechins and catechins–Zn complex loaded β -chitosan nanoparticles of different particle sizes. *Carbohydrate Polymers*, 137: 82–91
- Zou L.-Q., Peng S.-F., Liu W., Gan L., Liu W.-L., Liang R.-H., Liu C.-M., Niu J., Cao Y.-L., Liu Z., Chen X. 2014. Improved *in vitro* digestion stability of (—)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Research International*, 64: 492-499
- Zuidam N. J., Shimoni E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. V: Encapsulation technologies for active food ingredients. Zuidam N. J., Nedović V. A. (eds.). New York, Springer: 3-30

- Zvonar A., Gašperlin M. 2011. Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. *Farmaceutski vestnik*, 62: 131-138
- Zvonar A., Kristl J. 2012. Nanoinkapsuliranje v živilski industriji: metode in prednosti. V: *Nanotehnologije in nanoživila*. 27. Bitenčevi živilski dnevi, 26. september 2012, Ljubljana. Demšar L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 31-47

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrih za pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu ter za pregled doktorske naloge.

Hvala predsednici komisije prof. dr. Poloni Jamnik in članoma komisije prof. dr. Julijani Kristl in višjemu znan. sod. dr. Marjanu Beletu za temeljit pregled doktorske naloge in veliko koristnih napotkov.

Hvala Marjanu Beletu za številne slike elektronske mikroskopije. Hvala za vztrajnost in spodbudo.

Za pomoč pri analizah FTIR in DSC se zahvaljujem prof. dr. Romani Cerc Korošec s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, za pomoč pri analizah površinske napetosti se zahvaljujem prof. dr. Ksenji Kogej in Vesni Arrigler, prav tako s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Hvala vsem sodelavcem Katedre za biokemijo in kemijo živil za prijetno vzdušje in pomoč pri eksperimentalnem delu. Hvala Nataši Šegatin in Mirjani za pomoč pri fizikalno-kemijskih analizah polisaharidov. Posebej hvala Mihaeli za sodelovanje in pomoč pri analizah HPLC ter za vse spodbudne besede.

Saša, Tjaša, Marko, Ajda, Katja, Neda, Ana – hvala vam, zaradi vas so bila vsa ta leta tudi vesela.

Nazadnje še najpomembnejše. Hvala družini za vso podporo, ko sem jo najbolj potrebovala. Jaka – hvala ti za vse!

PRILOGE

Priloga A: Dovoljenje za objavo članka z naslovom »Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles« v doktorski disertaciji v tiskani in elektronski obliki
Annex A: A licence agreement for reuse of the article titled »Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles« in the thesis/dissertation in electronic and printed version

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 21, 2016

This is a License Agreement between Katja Istenic ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK 1982084
Registered Company Number	
Customer name	Katja Istenic
License number	3813720276601
License date	Feb 21, 2016
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Journal of Food Engineering
Licensed content title	Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles
Licensed content author	Katja Istenič, Bojana D. Balanč, Verica B. Djordjević, Marjan Bele, Viktor A. Nedović, Branko M. Bugarski, Nataša Poklar Ulrih
Licensed content date	December 2015
Licensed content volume number	167
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	8
Start page	196
End page	203
Tape of use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	yes
Will you be translating?	no
Title of your thesis/dissertation	Microencapsulation of catechins and pomegranate (<i>Punica granatum</i> L.) extracts into polysaccharide matrice
Expected completion date	May 2016

Estimated size (number of pages)	130
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.00 EUR / 0.00 GBP
Total	0.00 EUR

TERMS AND CONDITIONS

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically

revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world English rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage. Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author- incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately

via their non-commercial person homepage or blog by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement

- after the embargo period

via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI

- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do

- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. Posting to a repository: Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier: Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder. Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license: CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.8

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Priloga B: Članek »Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles«.
Annex B: The article »Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles«.

Journal of Food Engineering 167 (2015) 196–203



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng



Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles



Katja Istenič^a, Bojana D. Balanč^b, Verica B. Djordjević^b, Marjan Bele^c, Viktor A. Nedović^d,
Branko M. Bugarski^b, Nataša Poklar Ulrih^{a,*}

^a Department of Food Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^b Department of Chemical Engineering, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Serbia

^c National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19, SI-1001 Ljubljana, Slovenia

^d Department of Food Technology and Biochemistry, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Nemanjina 6, 11080 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2014

Received in revised form 30 March 2015

Accepted 7 April 2015

Available online 22 April 2015

Keywords:

Encapsulation

Submicron particles

Emulsification

Alginate

Resveratrol

ABSTRACT

Resveratrol-loaded alginate submicron particles were prepared by emulsification followed by external gelation. Scanning electron microscopy analysis of the air-dried and freeze-dried submicron particles demonstrated their spherical shape, from 100 nm to 600 nm in size. The encapsulation efficiency and loading for resveratrol were 24.5% ($\pm 1.6\%$) and 0.3% ($\pm 0.05\%$), respectively. The interactions between the encapsulated resveratrol and alginate were characterised by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. The release from the alginate submicron particles was successfully described by the linear superimposition model, which allowed concluding that resveratrol transport is governed by Fick's diffusion. The alginate submicron particles were prepared from materials that are considered as generally recognized as safe, and thus have good potential for use as a resveratrol delivery system in food products.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Resveratrol is a photosensitive natural polyphenolic compound that is found in red wine, berries, legumes, pistachios, and peanuts (Sanna et al., 2012). As a strong antioxidant (Csuk et al., 2013), an anti-inflammatory (Martinez and Moreno, 2000), a cancer-fighting (Vislovukh et al., 2013), and a cardioprotective (Tedesco et al., 2013) agent resveratrol has attracted great interest for its application in functional foods, nutraceuticals, and pharmaceutical products. However, its use is limited due to its low chemical stability, poor solubility, inefficient systemic delivery, and low bioavailability. In this context, the encapsulation of resveratrol into different matrices or delivery systems has become a great challenge.

Recently, interest in the incorporation of bioactive compounds into different polymer matrices to enhance their stability and bioavailability has been growing rapidly (Fang and Bhandari, 2010; Munin and Edwards-Lévy, 2011). Alginate is one of the most commonly applied materials for microencapsulation of bioactive compounds, as it can protect them from adverse environmental conditions and provide controlled release of the encapsulant (Madziva et al., 2006; Anbinder et al., 2011; Goh et al., 2012; Gombotz and Fong Wee, 2012). Various methods exist for production of alginate delivery systems most of them resulting in particles

in the size range of 100–2000 μm (Whelehan and Marison, 2011). However, such large particles can negatively affect the textural and sensorial properties of food products to which they are added. Indeed, it is preferable for solid encapsulates in food products to be $<25 \mu\text{m}$, so as not to be sensed (Tyle, 1993). Furthermore, such smaller particles have greater mechanical strength and a larger surface area per unit mass (Sakai et al., 2005). Recently, Paques et al. (2013) developed a novel procedure for the preparation of alginate particles in the submicrometer range through water-in-medium chain triglyceride oil emulsification coupled with external gelation with CaCl_2 nanoparticles. In this method, the CaCl_2 nanoparticles are dispersed in the oil continuous phase of the alginate-in-oil emulsion that is stabilised by polyglycerol polyricinoleate (PGPR). The nanoparticles thus dissolve in the interface of the alginate emulsion droplets and induce gelation. Using this procedure, alginate particles in the size range below 1 μm can be obtained.

As well as the obvious advantages in terms of the wide range of applications due to the size properties of these alginate submicron particles, another advantage of this method is that the external gelation maintains a mild pH inside the alginate submicron particles, in contrast to the low pH (which is harmful to sensitive compounds) that is characteristic of submicron particles that are produced by methods that use internal gelation processes (e.g., those induced by addition of an oil-soluble acid) (Silva et al., 2006; Ribeiro et al., 2005). Moreover, the external gelation method avoids clustering of the alginate droplets and formation

* Corresponding author. Tel.: +386 1 3203780; fax: +386 1 2566296.

E-mail address: natasa.poklar@bf.uni-lj.si (N.P. Ulrih).

of multiple emulsion droplets (water-in-oil-in-water) as a by-product, a phenomenon that is typical with emulsification/internal gelation methods (Poncelet et al., 1992; Paques et al., 2014). Finally, this alginate-emulsion-based method can be scaled up more easily to industrial sizes than other nozzle-based methods.

In this study, we examined the feasibility of encapsulation of resveratrol in these alginate submicron particles by applying the method of Paques et al. (2013), to develop a resveratrol delivery system. The alginate–resveratrol submicron particles were characterised in terms of their morphology, encapsulation efficiency, resveratrol loading and release. Furthermore, the interactions between resveratrol and alginate were evaluated using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) analyses.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The materials were used as received, as: calcium chloride dihydrate ($\geq 99\%$), acetonitrile ($\geq 99.9\%$) (both from Sigma), ethanol (96%), *n*-hexane ($\geq 99\%$), methanol ($\geq 99.9\%$), acetic acid ($\geq 99.8\%$), hydrochloric acid (fuming, 37%) (all from Merck) and phosphate-buffered saline (PBS; Oxoid). Alginic acid sodium salt from brown algae (Sigma), PGPR 4150 (Palsgaard), resveratrol (98.8%; ChromaDex) were of food grade. The vegetable oil (refined edible sunflower oil with 11% of saturated fat; Zvijezda) was purchased on the Slovenian market.

2.2. Alginate and alginate–resveratrol submicron particles formulation

Alginate submicron particles were prepared using the emulsification method followed by external gelation, according to Paques et al. (2013). The first step was the preparation of CaCl_2 nanoparticles, where 0.1 M $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 96% ethanol was added to vegetable oil containing 6% (w/w) PGPR, to a final concentration of 5% (w/w) ethanol solution. The mixture was sonicated on ice (750 W ultrasonic processor VCX; Sonics) for 30 min, at 30% amplitude, with sonication cycles of 10 s on, 10 s off, to allow formation of the ethanol-in-oil nanoemulsion. The CaCl_2 nanoparticles in the oil were formed when the ethanol was evaporated off from the emulsion during stirring overnight, on a magnetic stirrer at room temperature.

The next step was the preparation of the alginate submicron particles, both empty and loaded with resveratrol. Here, resveratrol was first dispersed in alginate aqueous solution in an ultrasonic bath to a final concentration of 1 mg/mL. Then, 1% or 2% (w/w) alginate (for empty submicron particles) or alginate–resveratrol dispersion (for resveratrol-loaded submicron particles) in water was added to vegetable oil containing 6% (w/w) PGPR, to the final concentration of 15% (w/w) alginate solution or alginate–resveratrol dispersion. The mixtures were homogenised at 11,000 rpm for 5 min (Micra D-9 homogeniser–dispenser). The oil phase containing the CaCl_2 nanoparticles was then added to the alginate-in-oil emulsion to a ratio of 2:1 or 3:1, respectively. The mixtures were stirred overnight to allow absorption of the CaCl_2 nanoparticles onto the surface of the alginate droplets and the formation of calcium alginate submicron particles. These submicron particles were removed from the oil phase by centrifugation ($13,000 \times g$, 30 min)

and washed three times with distilled water to minimise the residual oil. The submicron particles were freeze dried (Christ Alpha 1-2 LD freeze dryer) for 48 h at -50°C and 0.056 mbar before further analysis. All the formulations were prepared in triplicate.

2.3. Scanning electron microscopy imaging of alginate–resveratrol submicron particles

The surfaces of air-dried and freeze-dried alginate and alginate–resveratrol submicron particles were examined by scanning electron microscopy (SEM). As indicated above, the alginate and alginate–resveratrol submicron particles were separated from the oil phase by centrifugation ($13,000 \times g$, 30 min). The oil supernatant was discarded and for the SEM imaging the submicron particles were washed 3 times with hexane to remove the residual oil. After the third wash, the pellet that contained the submicron particles was dried in air and resuspended in distilled water. For the SEM imaging of air-dried samples the submicron particles were dried on a membrane filter. A drop of water suspension containing the submicron particles was put on 0.24 μm pore sized filter in a vacuum filtration device. Water was removed from the sample by vacuuming while the submicron particles were caught on the filter surface and washed with a small amount of fresh distilled water. The filter was dried at room temperature and stored in a desiccator until analysis. For the SEM imaging of freeze-dried alginate and alginate–resveratrol submicron particles, the water suspension of the submicron particles was frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for 48 h at -50°C and 0.056 mbar. Before the SEM, the samples were mounted in the sample holder using double-sided conductive carbon tape. The samples were then observed under field-emission SEM (Supra 35 VP scanning electron microscope; Carl Zeiss), at an accelerating voltage of 1 kV. The size distribution of the alginate and alginate–resveratrol submicron particles was determined from the SEM images, using the Image J software (Ighathinathane et al., 2008; Murawska et al., 2013).

2.4. High performance liquid chromatography analysis of resveratrol

The resveratrol concentrations were determined by HPLC (1260 Infinity; Agilent Technologies) using a Zorbax Eclipse Plus C18 column (Agilent Technologies; 4.6 mm \times 150 mm; 3.5 μm). The mobile phase was methanol–water–acetic acid (50:49.75:0.25; v/v/v), at a flow rate of 0.5 mL/min, with detection in the ultraviolet at a wavelength of 306 nm. Each analysis was performed in triplicate. To calculate the concentrations of resveratrol, a calibration curve was prepared by measuring the peak areas of known resveratrol standards in the concentration range from 0.05 $\mu\text{g/mL}$ to 13 $\mu\text{g/mL}$.

2.5. Encapsulation efficiency and drug loading

The encapsulation efficiency and drug loading were determined indirectly by measurement of the resveratrol concentration in the oil phase. The alginate–resveratrol submicron particles were separated from the oil by centrifugation at $20,000 \times g$ for 1 h. The oil supernatant was diluted 10-fold in *n*-hexane and analysed by HPLC. The encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) were calculated according to Eqs. (1) and (2), respectively:

$$EE\% = \frac{\text{weight of total added resveratrol} - \text{weight of resveratrol in the oil phase}}{\text{weight of total added resveratrol}} \times 100 \quad (1)$$

$$DL\% = \frac{(\text{weight of total added resveratrol} - \text{weight of resveratrol in the oil phase})}{\text{weight of the submicron particles}} \times 100 \quad (2)$$

2.6. In-vitro release study

For the *in-vitro* resveratrol release study, 70 mg of alginate–resveratrol submicron particles were suspended both in 10 mL of 0.1 M HCl (pH 1.2) and in 10 mL of PBS (pH 7.2). The samples were incubated at 37 °C with continuous stirring. At predetermined time intervals, the samples were centrifuged at 18,000×g for 15 min, to remove the submicron particles. The concentration of released resveratrol was determined by HPLC.

In order to evaluate the release mechanism of resveratrol from alginate submicron particles, the linear superimposition model (LSM) was applied which is a kinetic model that accounts for both Fickian and Case II transport effects in hydrophilic matrices (Berens and Hopfenberg, 1978):

$$M_t = M_{t,F} + M_{t,R} \quad (3)$$

where $M_{t,F}$ and $M_{t,R}$ are the contributions of the Fickian and relaxation processes, respectively, at time t . The purely Fickian process is described by the following equation:

$$M_{t,F} = M_{\infty,F} \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 k_F t) \right] \quad (4)$$

where $M_{\infty,F}$ is the compound release at equilibrium and k_F is the Fickian diffusion rate constant. The polymer relaxation effect can be described as a distribution of relaxation times, each assuming a first order-type kinetic equation (Berens and Hopfenberg, 1978):

$$M_{t,R} = \sum_i M_{\infty,R} [1 - \exp(-k_{R,i} t)] \quad (5)$$

where $M_{\infty,R}$ are the contributions of the relaxation processes for compound release and $k_{R,i}$ are the relaxation i th rate constants. For most cases, there is only one main polymer relaxation that influences transport, thus the above equation can be simplified using $i = 1$.

Finally, the linear superimposition model for compound release from particles can be described by:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = X \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \exp(-k_F t) \right] + (1 - X) [1 - \exp(-k_R t)] \quad (6)$$

where X is the fraction of compound released by Fickian transport.

The experimental data were analysed by fitting Eqs. (4) and (6) in order to assess the mechanism involved in resveratrol release from submicron particles at pH 1.2 and 7.2. Fitting to data was done by nonlinear regression analysis, using OriginPro 8.5 software. The quality of the regressions was evaluated according to methodology of Pinheiro et al. (2015), i.e. on the basis of the determination coefficient (R^2), the squared root mean square error (RMSE) and residuals visual inspection for randomness and normality. R^2 and SSE were obtained directly from the software, while RMSE was calculated from the square root of the sum of the squared residues (SSE) divided by the regression degrees of freedom. The precision of the estimated parameters was evaluated using the standardised halved width (SHW%), which was calculated as the ratio between the 95% standard error (obtained from the software) and the value of the estimate.

2.7. Fourier transform infrared spectroscopy

The interactions between the alginate submicron particles and the encapsulated resveratrol were analysed by FTIR. Infrared spectra of the samples were recorded with a FTIR spectrophotometer (BOMEM, Hartmann & Braun). The samples included alginate submicron particles without and with resveratrol, and pure resveratrol, and they were dried in a vacuum desiccator, gently triturated with micronised KBr powder, and compressed into discs, by pressing the powders (the KBr disc method). The discs were placed in the sample holder and scanned from 4000 cm^{-1} to 500 cm^{-1} , at a resolution of 4 cm^{-1} , at room temperature.

2.8. Differential scanning calorimetry

The thermal transition properties of the alginate submicron particles and resveratrol were measured using DSC. The DSC measurements were performed on a Mettler Toledo DSC 1 instrument, from 20 °C to 300 °C, with a heating rate of 10 K min^{-1} , in a dynamic argon atmosphere with a flow rate of 100 mL min^{-1} . Samples with an initial mass of 2–3 mg were carefully weighed into 40 μL aluminium crucibles on a Mettler Toledo MX5 balance and covered with a pierced lid. An empty Al crucible served as a reference. The thermal measurements were carried out on pure resveratrol, alginate, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, alginate submicron particles, alginate submicron particles with encapsulated resveratrol, and alginate submicron particles with subsequently added resveratrol.

3. Results and discussion

3.1. Scanning electron microscope imaging of alginate–resveratrol submicron particles

Different formulations for preparation of alginate submicron particles were tested; in specific, with 1% and 2% (w/w) alginate, and with two different weight ratios, 2:1 and 3:1, of the two phases, CaCl_2 -in-oil and alginate-in-oil. However only the formulation comprising 2% alginate solution and CaCl_2 nanoparticles-in-oil: alginate-in-oil ratio 2:1 was found to be successful according to the observations made during the preparation process; it was observed that the submicron particles could be resuspended in hexane after centrifugation even without a surfactant confirming that they are in a gelled state. As indicated by Paques et al. (2013), if the submicron particles were still in a liquid state, they would coalesce in the absence of a surfactant as observed with other formulations, especially during centrifugation, and no separate alginate submicron particles would be observed with SEM. SEM images of other formulations showed presence of aggregates and particles of irregular shape (Fig. 1a–c). Thus, for all further experiments the alginate submicron particles were prepared according to the above mentioned formulation.

The typical SEM images of the alginate and alginate–resveratrol submicron particles are shown in Fig. 1(d–f). All of these SEM images show the spherical submicron particles. No crystalline structures indicating CaCl_2 nanoparticles (Paques et al., 2012) are observed in the SEM images suggesting that the CaCl_2 nanoparticles have either dissolved into the alginate submicron particles or have been removed in the centrifugation and washing process. The size of the empty alginate submicron particles varied from

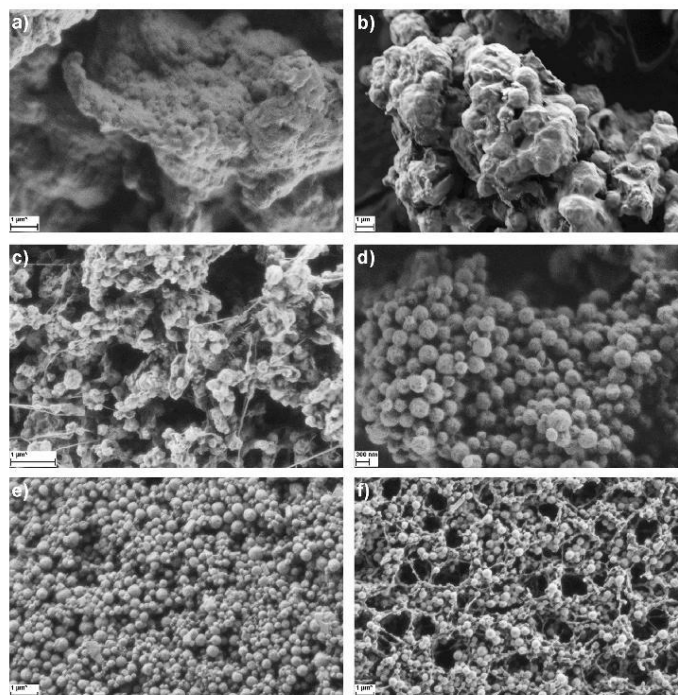


Fig. 1. SEM images of alginate submicron particles prepared from different formulations: freeze-dried submicron particles from 1% alginate with CaCl₂-in-oil and alginate-in-oil weight ratio 3:1 (a), freeze-dried submicron particles from 1% alginate with CaCl₂-in-oil and alginate-in-oil weight ratio and 2:1 (b), freeze-dried submicron particles from 2% alginate with CaCl₂-in-oil and alginate-in-oil weight ratio 3:1 (c), freeze-dried submicron particles from 2% alginate with CaCl₂-in-oil and alginate-in-oil weight ratio 2:1 (d), resveratrol loaded freeze-dried submicron particles from 2% alginate with CaCl₂-in-oil and alginate-in-oil weight ratio 2:1 (e) and membrane filter with airdried resveratrol loaded submicron particles prepared from 2% alginate with CaCl₂-in-oil and alginate-in-oil weight ratio 2:1 (f).

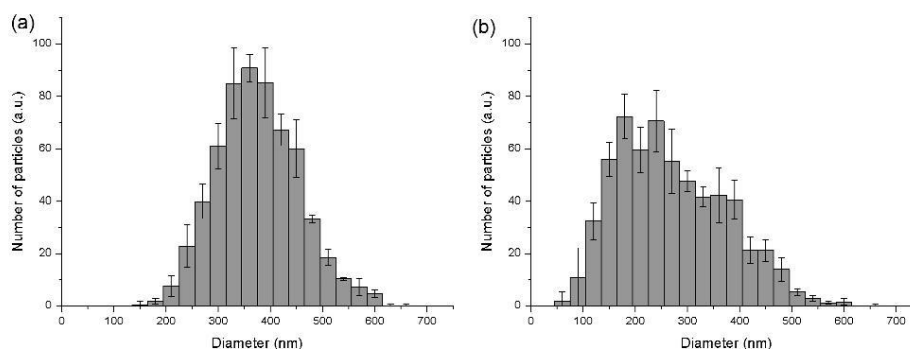


Fig. 2. Size distribution of alginate submicron particles (a) and alginate-resveratrol submicron particles (b); results are given as mean \pm standard deviation ($n = 3$).

110 nm to 630 nm (Fig. 2a) with average particle size of 360 nm while the size of the alginate-resveratrol submicron particles varied from 30 nm to 630 nm (Fig. 2b) with average particle size of 250 nm. It appears that as an amphiphilic molecule (with a hydrophobic aromatic ring and a hydrophilic phenolic hydroxyl group), resveratrol acts as a surface active compound along with

the PGPR used as surfactant. In comparison to the empty alginate submicron particles of Paques et al. (2013), with the majority sized at about 1 μ m, and a certain fraction being smaller (down to 200 nm), the submicron particles produced in this study were smaller (all <1 μ m). Here, it should be noted that different homogenisation speed for preparation of alginate-in-oil emulsion was used in the

two studies (11,000 rpm in this study and from 5000 to 10,000 rpm in the study of Paques et al. (2013)). Besides, in the case of the empty alginate submicron particles of Paques et al. (2013), the centrifugation and washing steps might result in some loss of smaller submicron particles, as the centrifugation speed was lower with Paques et al. (2013) (500×g to 1000×g, 30 min), in comparison to the centrifugation speed used in the present study (13,000×g, 30 min). The preserved structure and spherical shape of these alginate-resveratrol submicron particles after the air drying and freeze drying is one of the most important results in the present study, especially bearing in mind that alginate microparticles produced by external gelation in general crack or can totally collapse during air drying or oven drying (Stojanović et al., 2012), or at least they can lose their spherical shape during freeze drying. This was reported for the alginate-resveratrol microparticles (~200 µm) produced by the nozzle encapsulator in the study of Cho et al. (2014). For alginate microparticles, prepared by external gelation, alginate solution is often dripped into hardening bath composed of calcium chloride solution. In this case, the external gelation process is characterised by fast gelation which results in production of inhomogeneous gels. Calcium ions would first cross-link the surface of the microparticles as it is the first point of contact with the hardening bath. The cross-linked surface is consequently less permeable to the diffusion of ions into the interior of the microparticles. This results in a relatively less cross-linked interior and thus less homogenous structure of the microparticles. In contrast, the emulsification method followed by external gelation used in this study requires long gelation times (overnight) to ensure the sufficient absorption and diffusion of CaCl₂ nanoparticles into the alginate droplets. The gradual gelation process allows uniform distribution of calcium ions inside the alginate droplet and, in turn, formation of homogenous structure of the alginate submicron particles. The homogenous structure is crucial for uniform contraction of the matrix during drying which results in smooth surface and preserved structure of the alginate submicron particles (Paques et al., 2014; Chan et al., 2006).

3.2. Encapsulation efficiency and drug loading

The encapsulation efficiency and drug loading of the resveratrol within these alginate submicron particles were 24.5% (±1.6%) and 0.3% (±0.05%), respectively. To date, resveratrol has been encapsulated into alginate-based particles with efficiency ranging from 17% to 33% for poly(D,L-lactide-co-glycolide)-coated nanoparticles (Sanna et al., 2012), to 98% for calcium-alginate microparticles (Cho et al., 2014a). Resveratrol can establish extensive hydrogen bonding (via hydrophilic phenolic hydroxyl groups) and thus promote complexation with alginate polyelectrolyte capable of making H-bonds. The preparation procedure seems to have big impact on encapsulation efficiency. Thus, Cho et al. (2014a) achieved high values (95–98%) in water-based preparation medium, because resveratrol, as insoluble in water, remained undissolved during the crosslinking and hardening process and therefore, there was minimal loss of resveratrol during the hardening and washing stages. On contrary, in our study diffusion of resveratrol through the large specific surface area of small alginate droplets/submicron particles into the oil phase caused significant loss of resveratrol. The resveratrol loading of 0.3% (±0.05%) is also comparable to values reported for other formulations; e.g., ~0.15–0.3% for chitosan-coated and alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles (Sanna et al., 2012).

3.3. In-vitro release

The release profiles of the resveratrol from the alginate submicron particles in 0.1 M HCl (pH 1.2) and PBS (pH 7.2) at 37 °C are

shown on Fig. 3a and b, respectively. It can be seen that the release of resveratrol occurred within the first two hours, at both pH values. The maximum of 17.3% (±0.3%) of the resveratrol was released at both pH values. The intermolecular interactions between alginate and resveratrol (via hydroxyl groups of resveratrol) confirmed by FTIR and DSC analysis is the possible reason for such a low release percentage. The fact that resveratrol is only partially released from submicron particles leads us to a conclusion that alginate submicron particles can be considered suitable for oral administration, confirming good protection to incorporated resveratrol and allowing prolonged release after uptake. The diffusion of resveratrol from the submicron particles is characterised by a high initial rate in the first 10 min and, after this first stage, the diffusion rate decreases. This release profile is characteristic of reservoir systems, with an initially high release rate indicating the so-called “burst” effect typical for alginate matrix (Blandino et al., 2000; López-Córdoba et al., 2014). Also, the Fig. 3 shows that alginate submicron particles present a pH-dependent release pattern. In order to evaluate the mechanism of resveratrol release at both pH values, the experimental results are fitted by two models: Fick's second law (Eq. (4)) and LSM (Eq. (6)). The fitted curves are shown in Fig. 3a and b for pH 1.2 and 7.2, respectively, while models' parameters are presented in Table 1.

For both pH conditions, LSM fitted curves showed a better description of the experimental data than Fickian curves (R^2 of 0.985 versus 0.980 at pH 1.2 and 0.993 versus 0.942 at 7.2, for LSM and Fickian curves, respectively) indicating that the transport mechanism does not strictly follow Fick's behaviour. The same was concluded from LSM fitting for release of bioactive compounds from other polymeric matrices (Flores et al., 2007; Pinheiro et al., 2012, 2015). Still, the parameter X (defined as the Fick's diffusion contribution to the total release from the submicron particles) obtained from LSM fitting is for both pH conditions higher than 0.5 (see Table 1) indicating that Fick's diffusion is the main release mechanism. The Fickian diffusion rate constant is higher for pH 1.2 (Table 1) which may be related to conversion of the carrier material to insoluble alginic acid at pH 1.2 characterised by weaker hydrogen bonds cross-linking the alginic acid gel. Similar phenomenon, drug release faster from the transformed alginic acid matrices than from the calcium alginate matrices, was observed by other authors (Østberg et al., 1994; Jaya et al., 2010).

3.4. Fourier transform infrared spectroscopy

There were the following characteristic bands in the alginate spectrum: a peak at 3419 cm⁻¹, assigned to the —OH stretching group; a weak peak at 2925 cm⁻¹, related to —CH₂ groups (C—H stretching vibrations); two specific strong absorption bands at 1617 cm⁻¹ and 1420 cm⁻¹, attributed to asymmetric and symmetric stretching vibrations of COO— groups on the polymeric backbone; and the common peaks at 1034 cm⁻¹ and 1090 cm⁻¹, assigned to C—O—C (cyclic ether) stretching vibrations, the first of which was at a greater intensity (Fig. 4).

The FTIR spectrum of resveratrol showed the presence of a large band at ~3298 cm⁻¹, assigned to free O—H stretching vibrations. A double peak at ~1606 cm⁻¹ and ~1587 cm⁻¹ corresponds to C=C aromatic double-bond stretching, and C=C olefinic stretching respectively. Then, the peaks at ~1513 cm⁻¹ and ~1463 cm⁻¹ reflect the benzene skeleton vibrations, while C—O stretching vibrations were seen by the peak at ~1384 cm⁻¹ (Bertacche et al., 2006; Das et al., 2010). The peaks at ~988 cm⁻¹ and ~966 cm⁻¹ were ascribed to the bending vibration of C=C—H, and demonstrate the trans form of resveratrol (the trans-olefinic band) (Bertacche et al., 2006; Venuti et al., 2014).

There were several relevant changes in the spectrum of the alginate submicron particles with the encapsulated resveratrol in

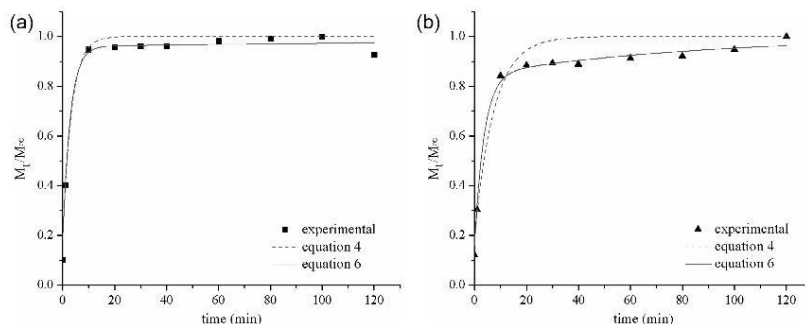


Fig. 3. Fick's (Eq. (4)) and Linear Superimposition Model (Eq. (6)) description of resveratrol release from alginate-resveratrol submicron particles at 37 °C in 0.1 M HCl (pH 1.2) (a) and in PBS (pH 7.2) (b).

Table 1

The results of fitting the Linear Superimposition Model (LSM) (Eq. (6)) to experimental data of resveratrol release. Evaluation of the quality of the regression on the basis of squared root mean square error (RMSE) and determination coefficient (R^2); X – the fraction of the compound released by Fickian transport, k_f – Fickian diffusion rate constant, k_r – relaxation rate constant. Estimates' precision is evaluated by the standardised halved width (SHW%) given in brackets.

pH	RMSE	R^2	X	k_f (min^{-1})	k_r (min^{-1})
1.2	3.3×10^{-2}	0.985	0.960 (3.12%)	0.345 (20.13%)	0.004 (305.3%)
7.2	2.3×10^{-2}	0.993	0.844 (3.76%)	0.274 (18.33%)	0.012 (35.3%)

comparison to the blank calcium alginate submicron particles, which confirmed that the resveratrol was successfully incorporated into the submicron particles. The peak characteristic for resveratrol at $\sim 1384 \text{ cm}^{-1}$ was also present in the spectrum of these alginate-resveratrol submicron particles. The sharp and strong peak of blank alginate at 1617 cm^{-1} appeared as a double peak in the spectrum of the alginate-resveratrol submicron particles, which probably resulted from overlaps in this region with peaks characteristic for resveratrol. There were changes in the positions and intensities of some peaks (e.g., from 3419 cm^{-1} , 1261 cm^{-1} , 1319 cm^{-1}) after the incorporated of resveratrol (e.g., to 3415 cm^{-1} , 1254 cm^{-1} , 1312 cm^{-1} , respectively), which indicated that there were interactions of the carboxylic and hydroxyl

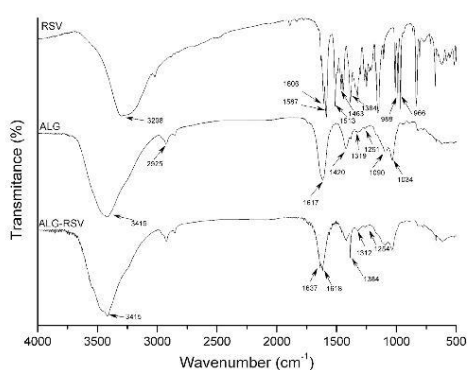


Fig. 4. Fourier transform infrared spectroscopy of resveratrol (RSV), alginate submicron particles (ALG), and alginate-resveratrol submicron particles (ALG-RSV).

groups of alginate with resveratrol. Similarly, based on the peak shift of the hydroxyl bond to a lower wavenumber after the formation of the resveratrol-loaded alginate microparticles, Cho et al. (2014b) concluded that there were molecular interactions between alginate and resveratrol.

3.5. Differential scanning calorimetry

The DSC curves of the raw materials and the alginate submicron particles without and with resveratrol are shown in Fig. 5. The alginate decomposition is seen as several successive exothermic peaks in the temperature range from $210 \text{ }^\circ\text{C}$ to $265 \text{ }^\circ\text{C}$. The DSC curve of alginate submicron particles did not show the characteristic melting peaks for CaCl_2 at $48 \text{ }^\circ\text{C}$ and $176 \text{ }^\circ\text{C}$ which confirms the absence of CaCl_2 crystalline state and interactions between alginate and CaCl_2 . The DSC curve of resveratrol showed a sharp endothermic peak, which corresponded to the melting of the resveratrol crystalline structure at the onset temperature of $266 \text{ }^\circ\text{C}$. In the DSC curves of the alginate submicron particles and the alginate-resveratrol submicron particles (see Fig. 5, inset), the exothermic peak of the alginate decomposition appeared at the onset temperature of around $220 \text{ }^\circ\text{C}$, as has also been observed for pure alginate (González-Rodríguez et al., 2002). The DSC curve

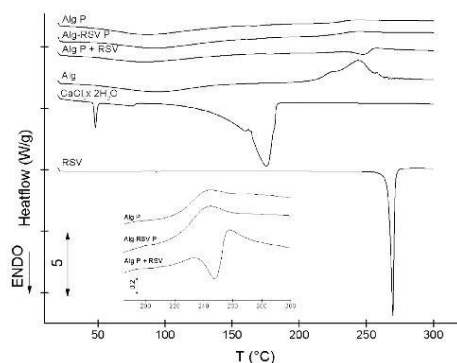


Fig. 5. DSC curves of alginate submicron particles (Alg P), alginate-resveratrol submicron particles (Alg-RSV P), alginate submicron particles with subsequently added resveratrol (Alg P + RSV), alginate (Alg), $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, and resveratrol (RSV).

of the alginate–resveratrol submicron particles did not show the melting peak of the resveratrol, which confirmed the absence of the resveratrol crystalline state, and which suggested that the encapsulated resveratrol is in an amorphous solid state that is dispersed in the alginate matrix (Makraduli et al., 2013). Similar data were reported by Cho et al. (2014) for resveratrol-loaded Ca-alginate microparticles, which indicated that the absence of the resveratrol peak was due to the resveratrol encapsulation within the microparticles.

To further understand the interactions between the resveratrol and alginate submicron particles, resveratrol was added to the water suspension of empty alginate submicron particles, which were then incubated on a stirrer overnight. This mixture was freeze dried and the DSC measurements were taken. The resulting curve showed a small exothermic peak beginning at 210 °C, which turns into an endothermic direction at around 238 °C, and then again into an exothermic direction at 253 °C. The first change here most probably shows the process of the thermal decomposition of alginate. The resveratrol melting peak at 265 °C was absent, which showed that intermolecular interactions between alginate and resveratrol took place (Sanna et al., 2012).

4. Conclusions

The data in the present study demonstrate that resveratrol-loaded alginate submicron particles were successfully prepared using the emulsification technique followed by external gelation. Encapsulation of resveratrol resulted in an encapsulation efficiency of 24.5% ($\pm 1.6\%$) and drug loading of 0.3% ($\pm 0.05\%$). The release studies showed high initial rate of resveratrol release in the first 10 min, indicating the so-called “burst” effect. The linear superimposition model showed that resveratrol release was diffusion-governed ($X > 0.5$). The submicron particles were composed of materials that are considered as generally recognized as safe. The submicron particles can be separated from the oil phase by centrifugation and washing the particles with distilled water and, in turn, the use of toxic solvents is not needed. Due to their submicron size the particles offer wide range of application and by encapsulation of resveratrol we have shown that they represent a potential delivery system in food products. Further studies should now be oriented towards optimising process parameters, such as the initial resveratrol concentration and the alginate and calcium chloride concentrations, to increase the encapsulation efficiency.

Acknowledgments

This work was supported by the COST action FA1001 (STM to BB), the Ministry of Education, Science and Sport, Republic of Slovenia (Programme P4-0121) and the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia (Project No. III46010). The authors would like to thank Dr. Romana Cerc Korošec for performing the DSC measurements.

References

Anbinder, P.S., Deladino, L., Navarro, A.S., Amalvy, J.L., Martino, M.N., 2011. Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. *J. Encapsul. Adsorption Sci.* 1, 80–87.

Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., 2000. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. *Enzyme Microbiol. Technol.* 27, 319–324.

Berens, A.R., Hopfenberg, H.B., 1978. Diffusion and relaxation in glassy polymer powders. 2. Separation of diffusion and relaxation parameters. *Polymer* 19, 489–496.

Bertacche, V., Lorenzi, N., Nava, D., Pini, E., Sinico, C., 2006. Host–guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocyd. Chem.* 55, 279–287.

Chan, L.W., Lee, H.Y., Heng, P.W.S., 2006. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydr. Polym.* 63, 176–187.

Cho, A.R., Chun, Y.G., Kim, B.K., Park, D.J., 2014a. Preparation of alginate–CaCl₂ microspheres as resveratrol carriers. *J. Mater. Sci.* 49 (13), 4612–4619.

Cho, A.R., Chun, Y.G., Kim, B.K., Park, D.J., 2014b. Preparation of chitosan–TPP microspheres as resveratrol carriers. *J. Food Sci.* 79, E568–E576.

Csuk, R., Albert, S., Siewert, B., 2013. Synthesis and radical scavenging activities of resveratrol analogs. *Arch. Pharm.* 346, 504–510.

Das, S., Ng, K.-Y., Ho, P.C., 2010. Formulation and optimization of zinc–pectinate beads for the controlled delivery of resveratrol. *AAPS PharmSciTech* 11, 729–742.

Fang, Z., Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 510–523.

Flores, S., Conte, A., Campos, C., Gerschenson, L., Del Nobile, M., 2007. Mass transport properties of tapioca-based active edible films. *J. Food Eng.* 81, 580–586.

Goh, C.H., Heng, P.W.S., Chan, L.W., 2012. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polym.* 88, 1–12.

Gombotz, R.W., Fong Wee, S., 2012. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 194–205.

González-Rodríguez, M.L., Holgado, M.A., Sánchez-Lafuente, C., Rabasco, A.M., Fini, A., 2002. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int. J. Pharm.* 232, 225–234.

Igathinathane, C., Pordesimo, L.O., Columbus, E.P., Batchelor, W.D., Methuki, S.R., 2008. Shape identification and particles size distribution from basic shape parameters using ImageJ. *Comput. Electron. Agr.* 63, 168–182.

Jaya, S., Durance, T.D., Wand, R., 2010. Physical characterization of drug loaded microcapsules and controlled *in-vitro* release study. *Open Biomater. J.* 2, 9–17.

López-Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M., 2014. Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. *Carbohydr. Polym.* 99, 150–157.

Madziva, H., Kailasapathy, K., Phillips, M., 2006. Evaluation of alginate–pectin capsules in cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT* 39, 146–151.

Makraduli, L., Crčarevska, M.S., Geskovski, N., Dodov, M.G., Goracinova, K., 2013. Factorial design analysis and optimisation of alginate–Ca–chitosan microspheres. *J. Microencapsul.* 30 (1), 81–92.

Martinez, J., Moreno, J.J., 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 59, 865–870.

Mumin, A., Edwards-Lévy, F., 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* 3, 793–829.

Murawska, M., Wiatr, M., Nowakowski, P., Szutkowski, K., Skrzypczak, A., Kozak, M., 2013. The structure and morphology of gold nanoparticles produced in cationic Gemini surfactant systems. *Radiat. Phys. Chem.* 93, 160–167.

Østberg, T., Lund, E.M., Graffner, C., 1994. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: IV. Release characteristics in different media. *Int. J. Pharm.* 112, 241–248.

Paques, J.P., van der Linden, E., Sagis, L.M.C., van Rijn, C.J.M., 2012. Food-grade submicrometer particles from salts prepared using ethanol-in-oil mixtures. *J. Agr. Food Chem.* 60, 8501–8509.

Paques, J.P., van der Linden, E., van Rijn, C.J.M., Sagis, L.M.C., 2013. Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl₂ nanoparticles. *Food Hydrocolloids* 31 (2), 428–434.

Paques, J.P., van der Linden, E., van Rijn, C.J.M., Sagis, L.M.C., 2014. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 209, 163–171.

Pinheiro, A.C., Bourbon, A.L., Cerqueira, M.A., Maricato, E., Nunes, C., Coimbra, M.A., Vicente, A.A., 2015. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* 115, 1–9.

Pinheiro, A.C., Bourbon, A.L., Quintas, M.A.C., Coimbra, M.A., Vicente, A.A., 2012. K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 16, 227–232.

Poncellet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J.P., Neufeld, R.J., Fournier, A., 1992. Production of alginate beads by emulsification/ internal gelation. I. Methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 39–45.

Ribeiro, A.J., Silva, C., Ferreira, D., Veiga, F., 2005. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/ internal gelation technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (1), 31–40.

Sakai, S., Kawabata, K., Ono, T., Iijima, H., Kawakami, K., 2005. Development of mammalian cell-enclosing submicron-size agarose capsules (<100 μm) for cell therapy. *Biomaterials* 26, 4786–4792.

Sanna, V., Roggio, A.M., Siliani, S., Piccinini, M., Marceddu, S., Mariani, A., Sechi, M., 2012. Development of novel cationic chitosan- and anionic alginate-coated poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *Int. J. Nanomed.* 7, 5501–5516.

Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Gonçalves, A.R., Veiga, F., 2006. Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. *Int. J. Pharm.* 311 (1–2), 1–10.

Stojanović, R., Belšak-Cvitanović, A., Manojlović, V., Komes, D., Nedović, V., Bugarski, B., 2012. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J. Sci. Food Agric.* 92, 685–696.

Tedesco, L., Russo, M., Bilotto, S., Spagnuolo, C., Scognamiglio, A., Palumbo, R., 2013. Dealcoholated red wine induces autophagic and apoptotic cell death in an osteosarcoma cell line. *Food Chem. Toxicol.* 60, 377–384.

- Tyle, P., 1993. Effect of size, shape and hardness of particles in suspension on oral texture and palatability. *Acta Psychol.* 84, 111–118.
- Venuti, V., Cannavà, C., Cristiano, M.C., Fresta, M., Majolino, D., Paolino, D., Stancanelli, R., Tommasini, S., Ventura, C.A., 2014. A characterization study of resveratrol/ sulfobutylether- β -cyclodextrin inclusion complex and *in-vitro* anticancer activity. *Colloids Surf., B* 115, 22–28.
- Vislovlukh, A., Kratassiouk, C., Porto, E., Galievska, N., Beldiman, C., Pinna, G., 2013. Proto-oncogenic isoform A2 of eukaryotic translation elongation factor eEF1 is a target of miR-663 and miR-744. *Br. J. Cancer* 108, 2304–2311.
- Whelehan, M., Marison, L.W., 2011. Microencapsulation using vibrating technology. *J. Microencapsul.* 28 (8), 669–688.

Priloga C: Dovoljenje za objavo članka z naslovom »Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes« v doktorski disertaciji v tiskani in elektronski obliki

Annex C: A licence agreement for reuse of the article titled »Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes« in the thesis/dissertation in electronic and printed version

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This Agreement between Katja Istenic ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3833810846597
License date	Mar 21, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of The Science of Food and Agriculture
Licensed Content Title	Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes
Licensed Content Author	Katja Istenič, Romana Cerc Korošec, Nataša Poklar Ulrih
Licensed Content Date	Feb 27, 2016
Pages	1
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Microencapsulation of catechins and pomegranate (<i>Punica granatum</i> L.) extracts into polysaccharide matrices
Expected completion date	May 2016
Expected size (number of pages)	130
Requestor Location	Slovenia
Billing Type	Invoice
Billing Address	Slovenia
Total	0.00 EUR

Terms and conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to

this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto.
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH

RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties.

This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. (see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee. Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Priloga D: Članek »Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes«.
Annex D: The article »Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes«.

Research Article



Received: 2 December 2015

Revised: 17 February 2016

Accepted article published: 27 February 2016

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jfsa.7691

Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes

Katja Istenič,^a Romana Cerc Korošec^b and Nataša Poklar Ulrih^{a*}

Abstract

BACKGROUND: (–)-Epigallocatechin gallate (EGCG) was encapsulated into liposomes that were further incorporated into alginate and chitosan microparticles. The stability of free and encapsulated EGCG in all three systems was evaluated at different pH values and in fruit nectar. Furthermore, the interactions between EGCG and the compounds of the microparticles were studied using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC).

RESULTS: All three encapsulation systems showed high encapsulation efficiency (>97%) and sustained release; in 14 days, no more than 15% of EGCG was released. The encapsulation systems successfully protected EGCG against degradation at alkaline pH. For non-encapsulated EGCG, >70% was degraded after 14 days, while there was no significant degradation of encapsulated EGCG in these three systems. In fruit nectar, >30% of non-encapsulated EGCG was degraded in 14 days, while only 6% of EGCG encapsulated into liposomes or chitosan microparticles reinforced with liposomes was degraded at that time. The DSC and FTIR analyses showed that the main interactions occurred between the liposomes and the EGCG.

CONCLUSION: This study demonstrates that liposomes as well as alginate and chitosan microparticles reinforced with liposomes have the potential to enhance EGCG stability in food products during storage.

© 2016 Society of Chemical Industry

Keywords: encapsulation; (–)-epigallocatechin gallate; liposomes; alginate; chitosan

INTRODUCTION

(–)-Epigallocatechin gallate (EGCG) is the major and most active polyphenol in green tea, where it accounts for 50–80% of all catechins.¹ Besides numerous health benefits,^{2–5} EGCG offers good potential as a food additive to replace artificial antioxidants and preservatives.^{6–8} However, the stability of EGCG is pH-, concentration- and temperature-dependent,⁹ and the use of EGCG in food products is often limited owing to its degradation under the conditions encountered during food processing and storage. Also, the quantity of polyphenolic compounds and their activities can be reduced owing to their association with proteins or other food components, to cause significant precipitation and aggregation.¹⁰ The use of encapsulated polyphenols instead of the free compounds provides an approach to solve these issues.¹¹ In this context the encapsulation of EGCG into different matrices or delivery systems has become a great challenge.

Among the numerous materials used for encapsulation of bioactive compounds, natural polysaccharides such as alginate and chitosan have received much attention owing to their biodegradability, lack of toxicity and formation of ionotropic gels.¹² Polyphenols from different sources have been encapsulated into alginate- and chitosan-based hydrogels.^{13–15} The main drawback of polysaccharide matrices for encapsulation of small hydrophilic molecules is their high porosity, which results in low encapsulation efficiency and rapid release of the core material.¹⁶ A possible approach to overcome this problem is to encapsulate the bioactive compounds into liposomes, followed by entrapping these liposomes within

a polysaccharide matrix.¹⁷ Indeed, a simple method for preparation of liposomes was described by Perrett *et al.*¹⁸ Their method involved the preparation of a proliposome mixture composed of lipids, ethanol and water, which was converted to liposomes by gradual dilution.

In the present study, EGCG was encapsulated in liposomes using the proliposome method. These liposomes were further mixed with alginate and chitosan solutions, and microparticles were prepared using an encapsulator based on vibrating nozzle technology. For comparison, EGCG was encapsulated into alginate and chitosan microparticles without liposomes. These microparticles were characterised in terms of encapsulation efficiency and drug release. The efficiency of these microparticles in protecting EGCG against adverse environmental conditions was determined through the remaining EGCG in the microparticles over time, at different pH values and in fruit nectar. The morphology of the microparticles was evaluated using light microscopy.

* Correspondence to: N Poklar Ulrih, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. E-mail: natasa.poklar@bf.uni-lj.si

^a Department of Food Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000, Ljubljana, Slovenia

^b Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Večna pot 113, SI-1000, Ljubljana, Slovenia

Furthermore, the interactions between EGCG and the compounds of the microparticles were studied using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC).

EXPERIMENTAL

Materials

The following materials were used as received: EGCG ($\geq 94\%$; Teavigo; Hermes Consilium, Ljubljana, Slovenia), Phospholipon 90 G (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany), alginate acid as the sodium salt from brown algae (product number A2158; viscosity 100–300 cP for 2% alginate solution in water at 25 °C), chitosan (product number 448869; viscosity 20–300 cP for 1% chitosan solution in 1% acetic acid at 25 °C, $\geq 75.0\%$ deacetylation, molecular weight 50 000–190 000 Da), calcium chloride dihydrate ($\geq 99\%$), sodium triphosphate pentabasic ($\geq 98\%$), citric acid monohydrate ($\geq 98\%$) and HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, $\geq 99.5\%$), all from Sigma (St. Louis, MI, United States). Formic acid and acetonitrile were from Sigma, and ethanol, methanol, acetic acid (glacial) and chloroform were from Merck (Darmstadt, Germany), and these were of analytical grade. Fruit nectar (Fruc orange and lemon; Fructal; Ajdovščina, Slovenia) was purchased on the Slovenian market.

High-performance liquid chromatography analysis of EGCG

EGCG concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; 1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a C18 column (4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μ m; Zorbax Eclipse Plus, Agilent Technologies). The mobile phase consisted of (A) 0.1% (v/v) formic acid and (B) 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile. HPLC elution was performed with the following linear gradient: 0–2 min, 92% A; 2–15 min, 92–65% A; 15–16 min, 65% A; 16–17 min, 65–92% A; 17–19 min, 92% A. The flow rate was 1 mL min⁻¹, with detection in ultraviolet absorption at 280 nm. To calculate the concentrations of EGCG, a calibration curve was prepared by measuring the peak areas of known EGCG standards from 1 to 100 μ g mL⁻¹.

Encapsulation of EGCG into liposomes and preparation of alginate and chitosan microparticles

EGCG-loaded liposomes were prepared using the proliposome method according to Perrett *et al.*¹⁸ EGCG has an amphiphilic character¹⁹ and we believe that when encapsulated in liposomes it will be bound to the membrane surface rather than being present within the hydrophilic core. Therefore the encapsulation into liposomes was performed as in the case of lipophilic compounds where the bioactive is added directly to the lipid and ethanol mixture.²⁰ Since EGCG is most stable in solutions with acidic pH,⁹ 0.1% (w/v) citric acid (pH 3.5) was used as a water phase for preparation of liposomes. A mixture of 1 g of Phospholipon 90 G and 0.1 g of EGCG was dissolved in a small amount of ethanol. Then 2 mL of 0.1% (w/v) citric acid was added to the mixture while stirring, and the mixture was heated to 60 °C for a few minutes. The mixture was cooled to room temperature and 50 mL of 0.1% (w/v) citric acid solution was added drop-wise while stirring, to allow the formation of liposomes.

The microparticles were prepared using an encapsulator (Encapsulator B-395 pro, Büchi, Flawil, Switzerland). For the EGCG-loaded microparticles, EGCG was added to 2% (w/w) alginate or chitosan solution, which was prepared in 1% (v/v) acetic acid, to a final

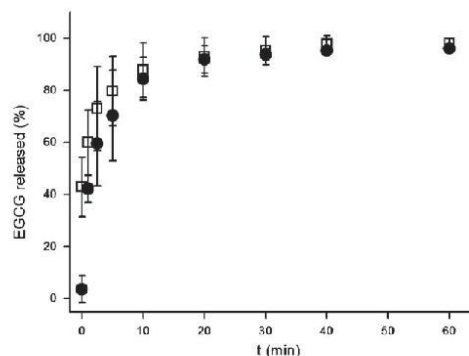


Figure 1. EGCG release from alginate (□) and chitosan (●) microparticles into aqueous solution at pH 5.5 and 25 °C. Data are mean \pm standard deviation ($n = 3$).

concentration of 0.67 mg mL⁻¹. For microparticles reinforced with liposomes, the suspension of empty and EGCG-loaded liposomes was mixed with 2% (w/w) aqueous alginate or chitosan solution at a ratio of 1:2 (v/v). The alginate and chitosan mixtures without and with the liposomes were pumped through the encapsulator, which was equipped with a 150 μ m nozzle, into a hardening bath. The 2% (w/w) alginate and chitosan mixtures containing liposomes were difficult to pump through the encapsulator nozzle and caused significant nozzle blockage. Reduction of alginate and chitosan concentrations to 1.5% (w/w) improved the encapsulation process and enabled continuous production of microparticles; therefore 1.5% (w/w) alginate and chitosan solutions were used for the preparation of the microparticles reinforced with liposomes.

Initially, the hardening bath contained 2% (w/v) CaCl₂ solution for alginate microparticles and 2% (w/v) sodium triphosphate solution for chitosan microparticles. When entering the hardening bath, the high surface tension of the 2% (w/v) solutions caused significant deformation of alginate and chitosan droplets containing liposomes, and fused rather than separate particles were formed. To reduce the impact of the surface tension on the microparticle production, the 2% (w/v) hardening solutions were replaced with 1% (w/v) CaCl₂ and sodium triphosphate solutions in all further experiments.

The encapsulator vibration frequency, electrode tension and pump rate were set to 1100 Hz, 1000 V and 2.5 mL min⁻¹ respectively. The microparticles were left in the gelling bath to harden for 30 min under mild stirring (200 rpm; IKA RCT basic magnetic stirrer, Staufen, Germany). For FTIR and DSC analyses, the microparticles were separated from the hardening bath, washed with fresh water, frozen in liquid nitrogen and freeze-dried (Christ Alpha 1–2 LD freeze-dryer, Osterode am Harz, Germany) at –50 °C and 0.056 mbar for 48 h. All formulations were prepared in triplicate.

Morphology of microparticles

The morphology of the wet alginate and chitosan microparticles without and with EGCG-loaded liposomes and the morphology of the EGCG-loaded liposomes in suspension were observed under a Leica DM750 optical microscope mounted with a Leica ICC50 HD digital camera (Wetzlar, Germany). The size of the microparticles and EGCG-loaded liposomes was estimated using ImageJ software.²¹

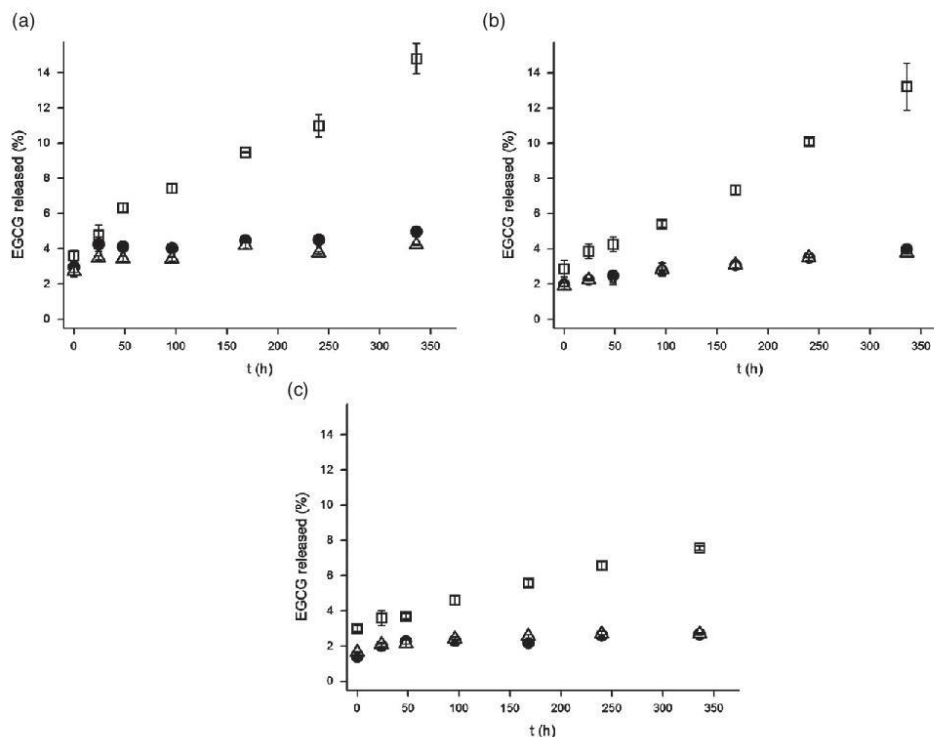


Figure 2. Release of EGCG from (a) liposomes, (b) alginate microparticles reinforced with liposomes and (c) chitosan microparticles reinforced with liposomes, according to pH of 2.0 (□), 4.0 (●) and 6.0 (△), at 25 °C. Data are mean ± standard deviation ($n = 3$).

Determination of encapsulation efficiency and drug loading

The samples of liposome suspension and hardening bath containing the microparticles were centrifuged ($10\,000 \times g$, 1 h) to remove the liposomes and microparticles. The amount of encapsulated EGCG was determined indirectly by measuring the concentration of EGCG in the supernatants by HPLC. The encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) were calculated using Eqns (1) and (2) respectively.

$$EE (\%) = \frac{\text{weight of total added EGCG} - \text{weight of EGCG in supernatant}}{\text{weight of total added EGCG}} \times 100 \quad (1)$$

$$DL (\%) = \frac{\text{weight of total added EGCG} - \text{weight of EGCG in supernatant}}{\text{weight of dried microparticles}} \times 100 \quad (2)$$

Release of EGCG from microparticles

After preparation of the alginate and chitosan microparticles, they were separated from the hardening bath by vacuum filtration. The microparticles were collected on the filter paper and transferred to Milli-Q water (Milli-Q Gradient system, Millipore, Darmstadt, Germany). The samples were incubated at 25 °C, and at predetermined times the concentration of released EGCG in the water was determined by HPLC.

Sustained release of EGCG from the liposomes and from the alginate and chitosan microcapsules reinforced with liposomes was expected. Therefore the release was monitored for 14 days at three different pH values: pH 2.0, pH 4.0 and pH 6.0. Aliquots of homogeneous microparticle and liposome suspensions were transferred into centrifuge tubes, and, after sedimentation of the microparticles and centrifugation ($10\,000 \times g$, 3 h) of the liposomes, the supernatants were replaced by buffer suspensions.

For the buffers at pH 2.0 and pH 4.0, 0.2% (w/v) and 0.01% (w/v) citric acid solutions respectively were used, while for pH 6.0, 10 mmol L⁻¹ HEPES buffer was used. The centrifuge tubes were stored at 25 °C in the absence of light, and at predetermined time points the samples were mixed well and centrifuged ($10\,000 \times g$, 1 h). The supernatants were sampled for the analyses. The total EGCG in each microparticle suspension was determined by disruption of the microparticles by sonication (750 W; VCX ultrasonic processor, Sonics, Newtown, Connecticut, United States) on ice for 2 min at 40% amplitude, with sonication cycles of 5 s on and 10 s off. The lipids from the suspensions of disrupted microparticles and liposomes were removed from the samples using the method of Bligh and Dyer.²² Here, 900 μL of the sonicated microparticle mixture or liposome suspension (diluted in water, 1:8 v/v) was mixed with 1 mL of methanol and 1 mL of chloroform. The mixtures were vortexed for 1 min and left at room temperature until the methanol/water and chloroform phases were separated. The

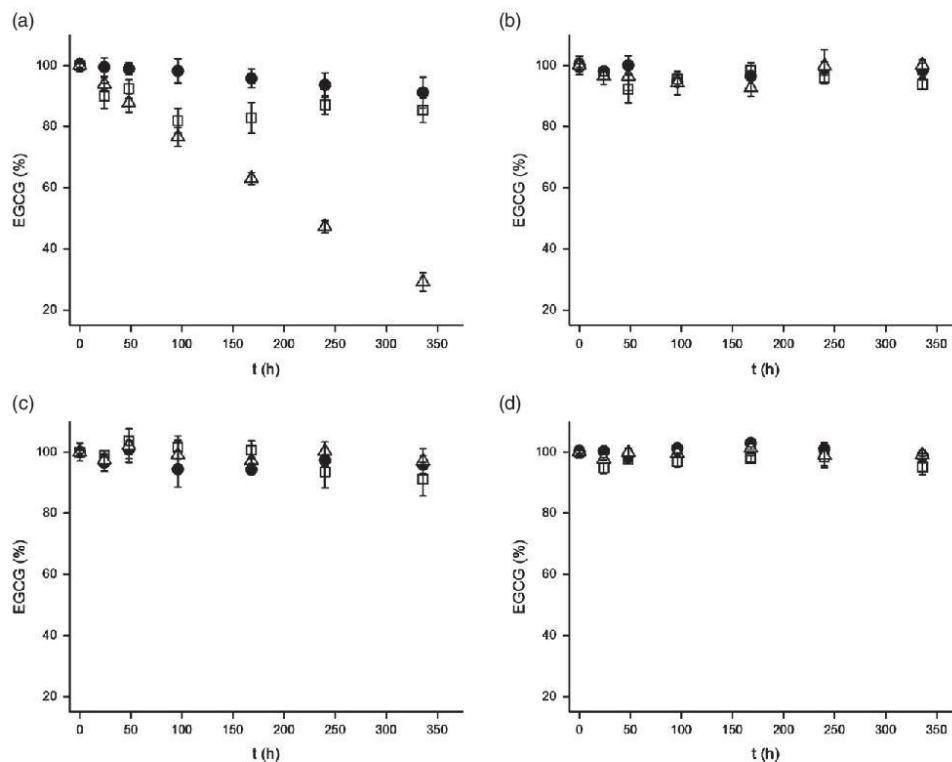


Figure 3. Stability of (a) non-encapsulated EGCG, (b) EGCG encapsulated in liposomes, (c) EGCG encapsulated in alginate microparticles reinforced with liposomes and (d) EGCG encapsulated in chitosan microparticles reinforced with liposomes, according to pH of 2.0 (□), 4.0 (●) and 6.0 (△), at 25 °C. Data are mean ± standard deviation ($n = 3$).

EGCG in the methanol/water phase was determined by HPLC. The EGCG release was calculated using Eqn (3).

$$\text{Release (\%)} = \frac{\text{amount of EGCG released from microparticles/liposomes}}{\text{total amount of EGCG in microparticle/liposome suspension}} \times 100 \quad (3)$$

Stability of encapsulated EGCG

According to Li *et al.*,⁹ the chemical stability of EGCG was determined by measuring EGCG concentrations with HPLC. Samples of EGCG-loaded liposomes and microparticles containing EGCG-loaded liposomes were incubated at pH 2.0, pH 4.0 and pH 6.0 at 25 °C. At predetermined time points, EGCG was extracted from the microparticles and liposomes as described above and the total amount of EGCG (released and extracted from the liposomes and microparticles) was determined by HPLC. Separately, non-encapsulated EGCG was incubated under the same experimental conditions (pH 2.0, pH 4.0 and pH 6.0, 25 °C) at concentrations equal to the concentrations of EGCG in liposome and microparticle suspensions at the starting time. The efficiency of the encapsulation systems in protecting EGCG was evaluated

by comparing the concentrations of remaining total EGCG in liposome and microparticle suspensions with the concentrations of remaining non-encapsulated EGCG.

Addition of microparticles and liposomes to fruit nectar

Aliquots of homogeneous microparticle and liposome suspensions were centrifuged ($10\,000 \times g$, 1 h) and the supernatants were carefully removed. Fruit nectar was added to a final encapsulated EGCG concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. The samples were stored at 25 °C in the absence of light for 14 days. A control sample was prepared containing non-encapsulated EGCG. At predetermined time intervals, samples were removed for determination of the total EGCG as described above.

Differential scanning calorimetry

The thermal transition properties of the raw materials, liposomes and microparticles were determined using DSC. The DSC measurements were performed on a Mettler Toledo DSC 1 instrument (Greifensee, Switzerland) from 20 to 300 °C, with a heating rate of 10 K min^{-1} , in a dynamic argon atmosphere with a flow rate of 100 mL min^{-1} . Samples with an initial mass of 2–3 mg were carefully weighed into 40 μL aluminium crucibles on a balance (Mettler Toledo MX5) and covered with a pierced lid. An empty aluminium

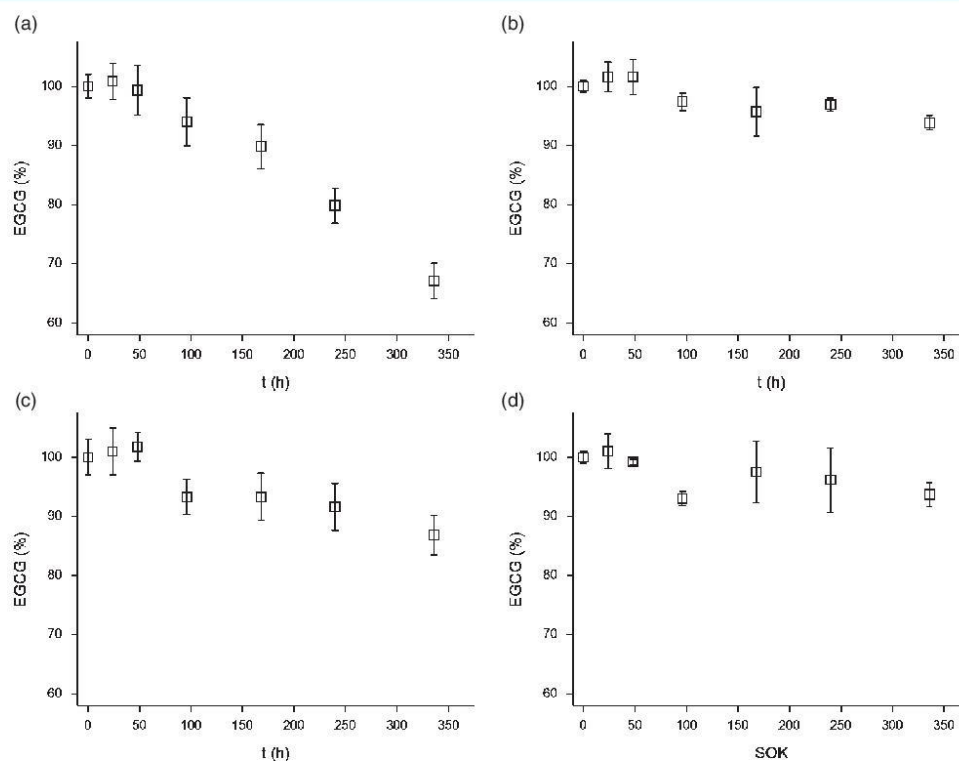


Figure 4. Stability of (a) non-encapsulated EGCG, (b) EGCG encapsulated in liposomes, (c) EGCG encapsulated in alginate microparticles reinforced with liposomes and (d) EGCG encapsulated in chitosan microparticles reinforced with liposomes in fruit nectar at pH 3.8 and 25 °C. Data are mean \pm standard deviation ($n = 3$).

crucible served as reference. The thermal measurements were carried out on pure EGCG, alginate, chitosan, liposomes, EGCG-loaded liposomes, EGCG-loaded alginate and chitosan microparticles, alginate and chitosan microparticles with empty liposomes, and alginate and chitosan microparticles with EGCG-loaded liposomes.

Fourier transform infrared spectroscopy

The FTIR spectra of the solid samples were recorded in the range from 4000 to 600 cm^{-1} using a spectrometer (Perkin Elmer Spectrum 100, Waltham, MA, USA) equipped with Specac Golden Gate Diamond Attenuated Total Reflectance as a solid sample support.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of encapsulation efficiency and drug loading

The encapsulation efficiency for the EGCG encapsulated into the alginate and chitosan microparticles was 0.83 ± 0.05 and $0.91 \pm 0.03\%$ respectively. The porous matrices of the alginate and chitosan microparticles and the good water solubility of EGCG contributed to the high diffusion of the EGCG from the microparticles during the particle formation process.²³ The encapsulation efficiency of the EGCG into the liposomes was $97.5 \pm 0.4\%$. This is comparable to the 92.1% encapsulation efficiency of EGCG into

nanoliposomes prepared by Zou *et al.*²⁴ When the EGCG-loaded liposomes were further encapsulated within the alginate and chitosan microparticles, the encapsulation efficiencies were 97.3 ± 0.3 and $98.7 \pm 0.1\%$ respectively. These data suggest that the EGCG-loaded liposomes retain their stability during the microparticle preparation process. The encapsulation efficiency for chitosan microparticles containing liposomes is higher than that for liposomes alone, since the presence of liposomes contributed to lower porosity of the microparticles and, in turn, a portion of non-encapsulated EGCG from the liposome suspension was additionally entrapped within the chitosan matrix.

For the microparticles, the high encapsulation efficiency is a result of entrapping the EGCG-loaded liposomes in the alginate and chitosan microparticles instead of the free form of EGCG. This approach has been used to enhance the encapsulation efficiency of catechins in calcium pectinate gel beads up to 78%.¹⁷ The higher encapsulation efficiency in the present study might be associated with the nature of the interactions of the different catechin molecules with the phospholipid membrane.²⁵ EGCG has the largest influence on the structural properties of the liposome membrane compared with (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin. Owing to the galloyl group of EGCG, it can form many hydrogen bonds, while the ester with gallic acid bound

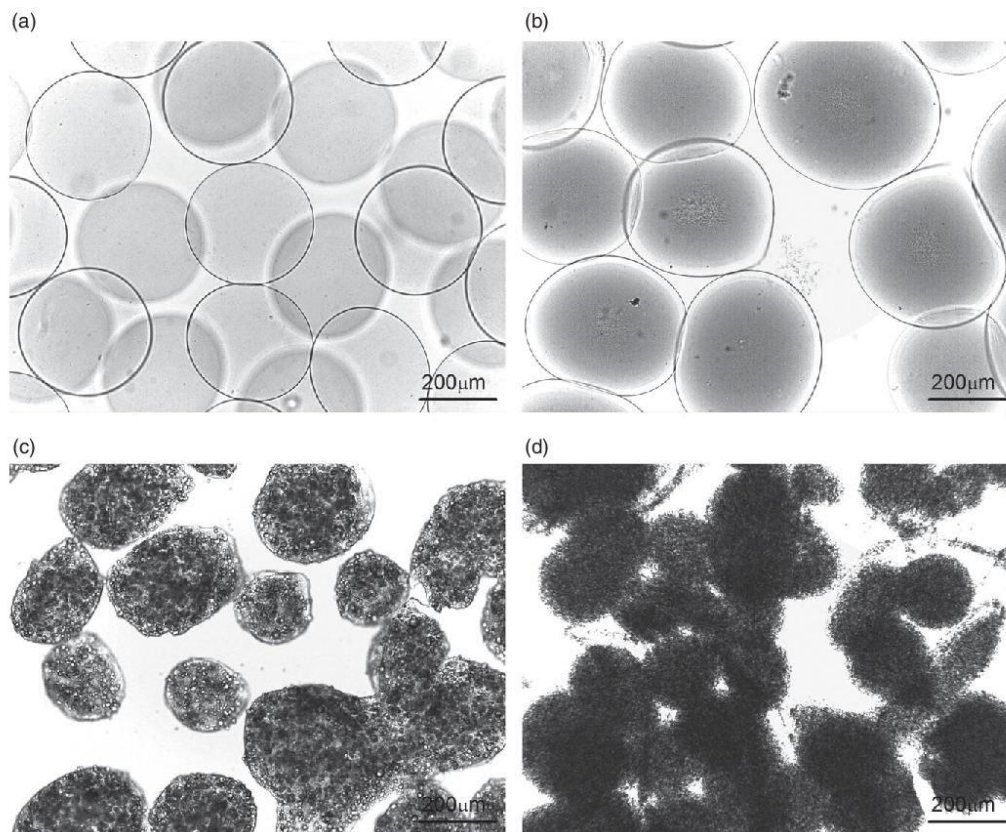


Figure 5. Representative light microscopy images of (a) alginate microparticles, (b) chitosan microparticles, (c) alginate microparticles reinforced with liposomes and (d) chitosan microparticles reinforced with liposomes in aqueous solution at pH 5.5 and 25 °C. Scale bars, as indicated.

to C3 of EGCG contributes to a more non-polar character of the molecule. These properties promote very strong interactions of EGCG with the lipid membrane.¹⁹

The alginate and chitosan microparticles loaded with EGCG-liposomes showed drug loading values of 2.4 ± 0.1 and $2.6 \pm 0.2\%$ respectively. These drug loading values are higher than the drug loading value of 0.6% for catechin-loaded calcium alginate microparticles prepared by Kim *et al.*²⁶ The same authors also prepared catechin-loaded calcium alginate microparticles using a non-conventional swelling and absorption method that resulted in drug loading values of 8.4 and 13.8% respectively. However, the drug loading value in the present study could be increased by using higher initial EGCG load in liposomes and by increasing the ratio between EGCG-liposome suspension and alginate or chitosan solution, which is under further investigation.

Release of EGCG from liposomes and microparticles

The release of EGCG from the alginate and chitosan microparticles is illustrated in Fig. 1. Both types of microparticles showed burst release of the EGCG, with the majority released in the first 20 min.

The liposomes and the alginate and chitosan microparticles reinforced with liposomes showed good sustained release of the EGCG (Fig. 2). The EGCG release rate from the alginate and chitosan microparticles reinforced with liposomes was only slightly lower than that from the liposomes alone, which suggests that only small amounts of the EGCG were captured within the alginate and chitosan matrices and that the EGCG release was mainly governed by the liposome stability and the characteristics of the liposome–EGCG interactions. Lower release rate and hence higher sustainability of the encapsulation systems were observed at pH 4.0 and pH 6.0. Lee *et al.*¹⁷ prepared calcium pectinate gel beads with entrapped catechin-loaded liposomes and also observed lower release rates of the encapsulant at alkaline pH values compared with acidic conditions. These data can be attributed to the stability of the liposomes, which are more stable at neutral pH than at strong acidic pH.²⁷ Zou *et al.*²⁴ also showed gradual release of EGCG from nanoliposomes: in 24 h, only 12.6% of the EGCG was released at pH 5.5. They attributed this gradual slow release to strong interactions between the phospholipids and the EGCG due to its amphiphilic structure, with the galloyl group as the lipophilic part and eight hydroxyl groups as the hydrophilic part.

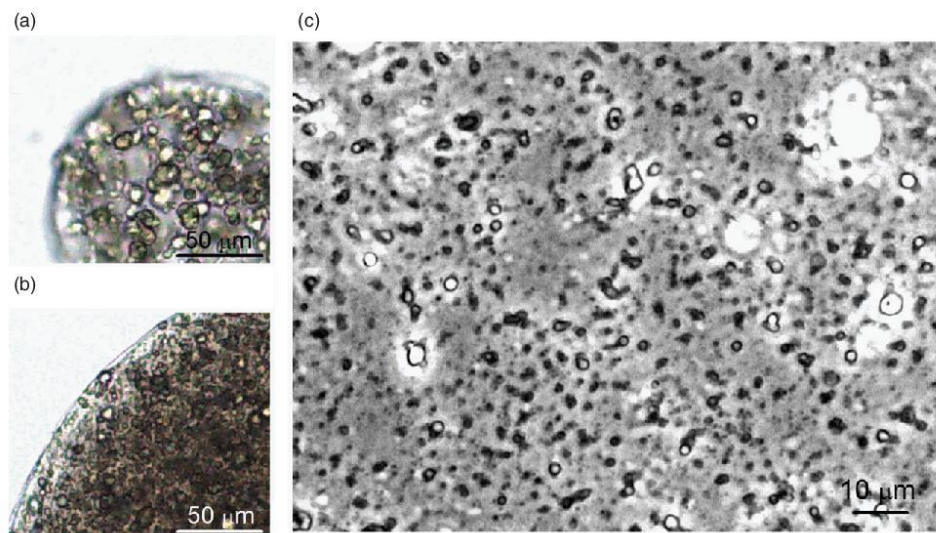


Figure 6. Representative magnifications of (a) alginate and (b) chitosan microparticles reinforced with liposomes, with (c) representative light microscopy image of suspension of liposomes encapsulating EGCG, all in aqueous solution at pH 5.5 and 25 °C. Scale bars, as indicated.

Stability of encapsulated EGCG

The efficiency of the encapsulation systems for the protection of the EGCG was studied according to the concentration of the remaining EGCG in the microparticle and liposome suspensions. This was then compared with the concentration of the remaining free EGCG. These data are illustrated in Fig. 3.

These EGCG stability tests show that the EGCG was most stable at pH 4.0. Here, after 14 days of incubation at 25 °C, only 9% of the EGCG was degraded. Over the same time, 15% of the EGCG was degraded at pH 2.0. The EGCG was least stable at pH 6.0: after 14 days, 71% was degraded. These data are consistent with the report of Li *et al.*⁹, where the highest stability of catechins was from pH 4.0 to pH 5.2; above pH 5.2, the EGCG degradation was accelerated as the pH was raised, while at pH < 4.0, the EGCG degradation was also more rapid. For the encapsulated EGCG in the present study, there was no significant degradation over time at all pH values. The encapsulation process did not affect the stability of the EGCG, and, owing to the low EGCG release rate, more than 90% of the initial amount of EGCG was preserved in the suspensions of liposomes and microparticles after 14 days even under the adverse environmental conditions (i.e. pH 2.0 and pH 6.0). No significant differences in the stability of EGCG were observed when encapsulated into liposomes or alginate and chitosan microparticles, suggesting that all these systems are suitable for EGCG encapsulation.

Addition of microparticles to fruit nectar

To determine the stability of EGCG in a food matrix, a storage test of the free EGCG and the EGCG encapsulated in the liposomes and the alginate and chitosan microparticles reinforced with liposomes was performed using orange nectar, which was at pH 3.8. Although the pH of the juice was acidic, degradation of the free EGCG was observed (Fig. 4). Over 14 days, more than 30% of the free EGCG was degraded, which suggests that pH alone is not enough to

stabilise EGCG in complex food products. According to Su *et al.*,²⁸ the combination of components such as sucrose, citric acid and ascorbic acid, which are often added to fruit beverages, can negatively affect catechin stability. Higher stability was observed for the encapsulated EGCG: in 14 days, 13% of the EGCG was degraded when encapsulated in the alginate microparticles reinforced with liposomes, while only 6% of the EGCG was degraded when encapsulated in the liposomes and chitosan microparticles reinforced with liposomes. Although no significant differences were observed in the stability of EGCG encapsulated into the different systems at different pH values (Fig. 2), in the fruit nectar the stability of the EGCG in the alginate microparticles reinforced with liposomes was slightly lower compared with the other two encapsulation systems. These data can be explained by the destabilisation of the liposome membranes due to the alginate interactions with the phospholipid bilayer.²⁹ Such destabilised membranes will be more susceptible to certain compounds in the fruit nectar, which will promote leakage and thus degradation of the EGCG.

Morphology of microparticles

Representative optical microscopy images of the alginate and chitosan microparticles without and with the liposomes are shown in Fig. 5. The size of the alginate microparticles was $320 \pm 10 \mu\text{m}$ and the size of the chitosan microparticles was $350 \pm 20 \mu\text{m}$. A size range of the microparticles was expected, as the diameter of the polysaccharide particles prepared by encapsulators based on vibrating nozzle technology is usually double the diameter of the nozzle (150 μm here).³⁰ The size of the microparticles containing liposomes was slightly reduced and was $270 \pm 30 \mu\text{m}$ for alginate microparticles containing EGCG-liposomes and $220 \pm 20 \mu\text{m}$ for chitosan microparticles containing EGCG-liposomes. In the preparation of alginate and chitosan microparticles without liposomes, the break-up of the liquid jet was possible to control owing to adequate viscosity of the fed solutions and resulted in the formation

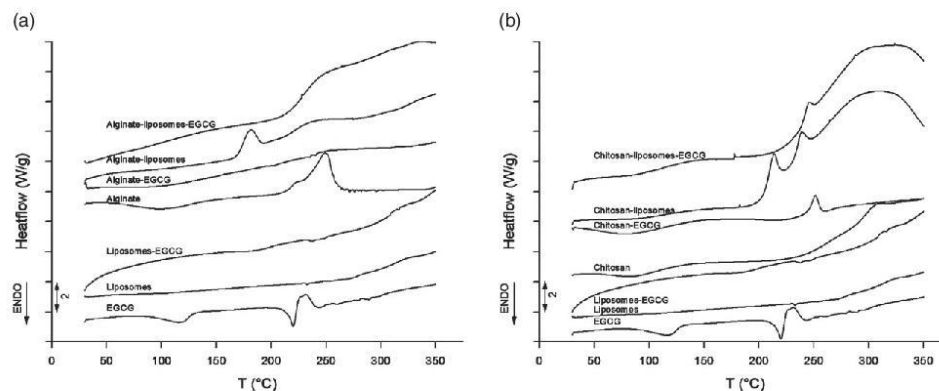


Figure 7. DSC curves of raw materials and encapsulation systems based on (a) alginate and (b) chitosan, as indicated.

of a single bead chain when pumped through the encapsulator nozzle. Upon the addition of the liposomes to the alginate or chitosan solution, the presence of the liposomes changed the hydrodynamic properties of the mixture, and pumping of the mixture through the encapsulator nozzle resulted in the formation of a spray and, in turn, in the formation of smaller particles. Spray is a characteristic of too high liquid flow rate;³⁰ however, reducing the flow rate resulted in nozzle blockage. Besides the non-uniform size distribution of the liposome-containing microparticles, irregularities such as tails and double particles can be seen in Figs 5c and 5d. Tails might be formed by the high impact forces on the droplets when they enter the hardening bath, and double particles are a consequence of droplet coalescence before entering the hardening bath.³⁰

The EGCG-loaded liposomes were successfully captured inside the alginate and chitosan matrices, as can be seen from the light microscopy images of a magnified part of the alginate and chitosan microparticles reinforced with liposomes (Figs 6a and 6b). The suspension of the liposomes encapsulating the EGCG is shown in Fig. 6c. The size of the liposomes was estimated at 1–2 μm , which is in agreement with Perrett *et al.*,¹⁸ who prepared liposomes using the proliposome-containing method that were in the size range 0.3–2 μm . We can assume that a population of smaller liposomes is also present in our samples but could not be observed using light microscopy.

Differential scanning calorimetry

The DSC curves for the raw materials, the EGCG-loaded liposomes and the alginate and chitosan microparticles without and with EGCG are shown in Fig. 7.

The DSC curve of pure EGCG showed an endothermic peak at 220 °C, which corresponds to the EGCG melting point.³¹ The exothermic peak that followed this endothermic peak most probably defines the thermal decomposition of the EGCG. At temperatures above 270 °C, the DSC curve of the liposomes turned slowly into the exothermic direction owing to lecithin degradation. The DSC curves of the liposomes and the EGCG-loaded liposomes were similar, although the EGCG melting peak was absent in the DSC curve of the EGCG-loaded liposomes. The disappearance of the EGCG melting peak suggests that there were significant interactions between the EGCG and the lipids and indicates the absence

of the EGCG crystalline state. The results suggest that the encapsulated EGCG is in an amorphous state of a solid molecular dispersion in the liposomes. Similar data were reported by Isailović *et al.*²⁰ for resveratrol-loaded liposomes.

For the DSC curve of alginate, its decomposition is seen as several successive exothermic peaks from 210 to 265 °C.³² The DSC curve of the alginate microparticles with the EGCG also showed the exothermic peak of alginate decomposition, at the onset temperature of around 200 °C, while the melting peak of EGCG was absent. In this case, this was the consequence of the very low encapsulation efficiency rather than the incorporation of the EGCG within the alginate microparticles. The DSC curve of the alginate microparticles with the liposomes showed an exothermic peak at 181 °C, which suggests interactions between the liposomes and the alginate. The lack of this peak and the lack of the characteristic EGCG melting peak in the DSC curve of the alginate microparticles with EGCG-loaded liposomes suggest that EGCG was in an amorphous solid state within the liposomes and the EGCG-loaded liposomes were entrapped within the alginate matrix.

The DSC curve of chitosan showed a broad exothermic peak with an onset temperature at around 240 °C and a peak positioned at about 290 °C that corresponded to the decomposition of the polymer.³¹ The DSC curve of the chitosan microparticles with the EGCG showed an exothermic peak at 251 °C that can be assigned to the ionic interactions between the chitosan and pentasodium triphosphate.³³ This peak was also seen at 239 and 246 °C in the DSC curves of the chitosan microparticles with liposomes and the chitosan microparticles with the EGCG-loaded liposomes respectively. In the DSC curve of the chitosan microparticles with liposomes, another exothermic peak was observed at 214 °C that might indicate an interaction between the liposomes and the chitosan. This peak and the EGCG melting peak were not seen in the DSC curve of the chitosan microparticles with the EGCG-loaded liposomes, and, as with the alginate microparticles with the EGCG-loaded liposomes, these data suggest that the EGCG is well encapsulated within the liposomes, while the EGCG-loaded liposomes remain entrapped within the chitosan matrix.

Fourier transform infrared spectroscopy

The FTIR spectra of the raw materials, the EGCG-loaded liposomes and the alginate and chitosan microparticles without and with EGCG are shown in Fig. 8.

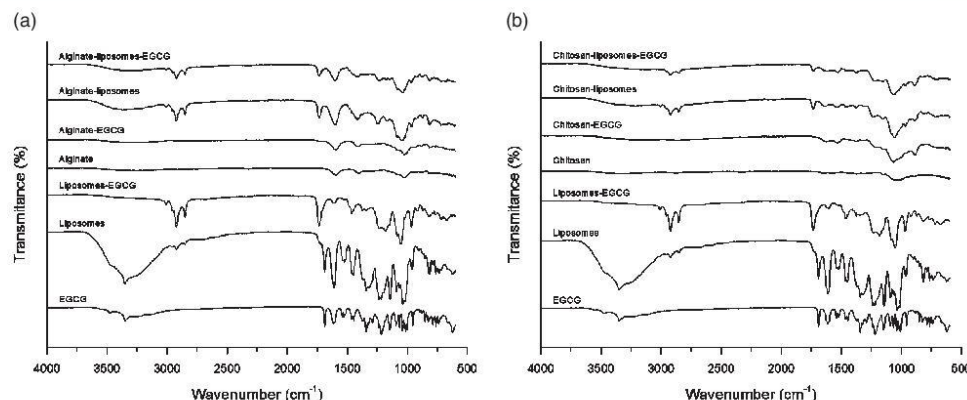


Figure 8. FTIR spectra of raw materials and encapsulation systems based on (a) alginate and (b) chitosan, as indicated.

The FTIR spectra of the raw materials are consistent with spectra from the literature. The FTIR spectrum of EGCG showed its characteristic peaks at the wavenumbers 828, 1041, 1146, 1219, 1344, 1447, 1518, 1616 and 1690 cm^{-1} , which can be assigned to C&bond;H alkenes, &bond;C&bond;O alcohols, C&bond;OH alcohols, &bond;OH aromatics, C&bond;O alcohols, C&bond;H alkanes, C&bond;C aromatic ring, C&bond;C alkenes and the carbonyl stretching of the gallic acid respectively.^{24,34} In the FTIR spectrum of the liposomes, small peaks at 2923, 2853 and 3353 cm^{-1} are superposed on a broad peak positioned from 2800 to 3500 cm^{-1} , which indicates O&bond;H stretching vibrations. This peak was broadened owing to hydrogen bonds. The small peaks around 2923 and 2853 cm^{-1} correspond to CH_2 anti-symmetric and symmetric stretching modes of the acyl chains respectively, whereas the peak at around 3353 cm^{-1} corresponds to vibration of the OH linkage of phenolic or hydroxyl groups.³⁴ The peak at 1465 cm^{-1} corresponds to CH_2 scissoring, and the peak at 1690 cm^{-1} corresponds to carbonyl stretching. The peaks near 1090 and 1220–1240 cm^{-1} correspond to symmetric and antisymmetric PO_2^- stretching respectively.³⁵ The characteristic EGCG peaks at 1344 and 1616 cm^{-1} were also seen in the spectra of the EGCG-loaded liposomes, which confirms the presence of the EGCG. The sharp peak of the empty liposomes at 1612 cm^{-1} appeared as a double peak in the spectrum of the EGCG-loaded liposomes, which was probably due to the overlapping with the characteristic EGCG peaks in this region. The peak for EGCG and the empty liposomes at around 3353 cm^{-1} was not seen in the spectrum of the EGCG-loaded liposomes, while the peak for EGCG and the empty liposomes at 1690 cm^{-1} shifted to 1735 cm^{-1} . These significant changes in the spectra of the EGCG-loaded liposomes in comparison with the pure compounds confirm that the EGCG was successfully incorporated into the liposomes.

The FTIR spectrum of alginate showed peaks at 1596 and 1407 cm^{-1} , which correspond to antisymmetric and symmetric CO_2^- stretching respectively. The peak at 1294 cm^{-1} corresponds to skeletal vibration, and the peak at 1026 cm^{-1} corresponds to C&bond;O&bond;C antisymmetric stretching and is attributed to the saccharide structure. Several characteristic peaks were identified on the FTIR spectrum of chitosan. The broad peak centred at 3341 cm^{-1} and the peak at 2865 cm^{-1} correspond to O&bond;H and C&bond;H stretching respectively. The peak at 1648 cm^{-1}

corresponds to C&bond;O stretching of the amide, and the peak at 1589 cm^{-1} corresponds to N&bond;H bending from the amine and amide II. The peak at 1376 cm^{-1} corresponds to CH_3 symmetrical deformation, the peak at 1152 cm^{-1} corresponds to anti-symmetric C&bond;O&bond;C stretching and C&bond;N stretching, and the peak at 1025 cm^{-1} corresponds to skeletal vibration of C&bond;O stretching.^{36–38}

The FTIR spectra of the alginate and chitosan microparticles with the encapsulated EGCG showed the peaks that were characteristic for pure alginate and chitosan. However, a new peak for the alginate microparticles with the EGCG was observed at 1722 cm^{-1} , and a peak for the chitosan microparticles was observed at 1219 cm^{-1} that is characteristic of EGCG. These data suggest that trace amounts of EGCG were present in the microparticles even though the encapsulation efficiency was <1%.

The peaks for the alginate microparticles with empty liposomes and the alginate microparticles with the EGCG-loaded liposomes were identical. Similarly, there were no differences between the FTIR spectra of the chitosan microparticles with empty liposomes and the chitosan microparticles with the EGCG-loaded liposomes. These data suggest that the EGCG remains well incorporated within the liposomes even after encapsulation of the EGCG-loaded liposomes inside the alginate and chitosan microparticles. The main interactions thus occurred between the EGCG and the liposomes and not between the EGCG and the alginate and chitosan.

CONCLUSIONS

EGCG was successfully encapsulated within liposomes and within alginate and chitosan microparticles reinforced with liposomes. All three of these encapsulation systems showed gradual release of EGCG and promoted the stability of EGCG in alkaline medium and in fruit nectar. These findings demonstrate that EGCG-loaded liposomes and alginate and chitosan microparticles containing EGCG-liposomes have the potential to stabilise EGCG in food products during storage.

The DSC and FTIR analyses showed that the main interactions occurred between the liposomes and the EGCG and that these interactions were not disrupted after the incorporation of the EGCG-loaded liposomes within the alginate and chitosan matrices.

Further studies should now be oriented towards optimising the formulations for the liposomes and the microparticle preparation, to achieve the desired characteristics for optimal functionality in selected food products, such as the specific morphology of the microparticles and the EGCG loading and release rates.

REFERENCES

- 1 Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N and Mukhtar H, Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* **66**: 2500–2505 (2006).
- 2 Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M and Algeri S, A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging* **23**: 719–735 (2002).
- 3 Mukhtar H and Ahmad N, Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* **71**: 1698–1702 (2000).
- 4 Donà M, Dell’Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, et al., Neurophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol* **170**: 4335–4341 (2003).
- 5 Taylor PW, Hamilton-Miller JMT and Stapleton PD, Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull* **2**: 71–81 (2005).
- 6 Yilmaz Y, Novel uses of catechins in foods. *Trends Food Sci Technol* **17**: 64–71 (2006).
- 7 Chen ZY and Chan PT, Antioxidative activity of green tea catechins in canola oil. *Chem Phys Lipids* **82**: 163–172 (1996).
- 8 Tang S, Kerry JP, Sheehan D, Buckley DJ and Morrissey PA, Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Res Int* **34**: 651–657 (2001).
- 9 Li N, Taylor LS, Ferruzzi MG and Mauer LJ, Kinetic study of catechin stability: effects of pH, concentration, and temperature. *J Agric Food Chem* **60**: 12531–12539 (2012).
- 10 Weerawatanakorn M, Huang Q and Ho C-T, Monitoring the binding processes of (–)-epigallocatechin gallate and theaflavin-3,3'-digallate to alpha-casein surface using quartz crystal microbalance with dissipation. *Int Food Res J* **21**: 493–499 (2014).
- 11 Fang Z and Bhandari B, Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci Technol* **21**: 510–523 (2010).
- 12 Sinha VR and Kumria R, Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int J Pharmaceut* **224**: 19–38 (2001).
- 13 López Córdoba A, Deladino L and Martino M, Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydr Polym* **95**: 315–323 (2013).
- 14 Zam W, Bashour G, Abdelwahed W and Khayata W, Alginate-pomegranate peels' polyphenols beads: effects of formulation parameters on loading efficiency. *Braz J Pharmaceut Sci* **50**: 741–748 (2014).
- 15 Belščak-Cvitanović A, Stojanović R, Manojlović V, Komes D, Cindrić IJ, Nedović V, et al., Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res Int* **44**: 1094–1101 (2011).
- 16 Rousseau I, Le Cerf D, Picton L, Argillier JF and Muller G, Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. *Eur Polym J* **40**: 2709–2715 (2004).
- 17 Lee J-S, Chung D and Lee HG, Preparation and characterization of calcium pectinate gel beads entrapping catechin-loaded liposomes. *Int J Biol Macromol* **42**: 178–184 (2008).
- 18 Perrett S, Golding M and Williams WP, A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. *J Pharm Pharmacol* **43**: 154–161 (1991).
- 19 Abram V, Berlec B, Ota A, Šentjurc M, Blatnik P and Ulrih NP, Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. *Food Chem* **139**: 804–813 (2013).
- 20 Isailović BD, Kostić IT, Zvonar A, Dordević VB, Gašperlin M, Nedović VA, et al., Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovat Food Sci Emerg Technol* **19**: 181–189 (2013).
- 21 Abramoff MD, Magalhães PJ and Ram SJ, Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* **11**: 36–42 (2004).
- 22 Bligh EG and Dyer WJ, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917 (1959).
- 23 McClements DJ, Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: potential and limitations of colloidal delivery systems. *Adv Colloid Interface Sci* **219**: 27–53 (2015).
- 24 Zou L, Peng S, Liu W, Gan L, Liu W, Liang R, et al., Improved *in vitro* digestion stability of (–)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Res Int* **64**: 492–499 (2014).
- 25 Hashimoto T, Kumazawa S, Nanjo F, Hara Y and Nakayama T, Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 2252–2255 (1999).
- 26 Kim ES, Lee J-S and Lee HG, Microencapsulation of catechin with high loading and encapsulation efficiencies using soaking methods. *Food Sci Biotechnol* **24**: 1735–1739 (2015).
- 27 Connor J, Yatvin MB and Huang L, pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1715–1718 (1984).
- 28 Su YL, Leung LK, Huang Y and Chen ZY, Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chem* **83**: 189–195 (2003).
- 29 Dhoot NO and Wheatley MA, Microencapsulated liposomes in controlled drug delivery: strategies to modulate drug release and eliminate the burst effect. *J Pharmaceut Sci* **92**: 679–689 (2003).
- 30 Whelehan M and Marison IW, Microencapsulation using vibrating technology. *J Microencapsul* **28**: 669–688 (2011).
- 31 Ponnuraj R, Janakiraman K, Gopalakrishnan S, Jayekumar HJ, Venkateswarlu V and Narayanan DS, Formulation and characterization of epigallocatechin gallate nanoparticles. *Indo Am J Pharmaceut Res* **5**: 767–779 (2015).
- 32 González-Rodríguez ML, Holgado MA, Sánchez-Lafuente C, Rabasco AM and Fini A, Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int J Pharmaceut* **232**: 225–234 (2002).
- 33 Gierszewska-Drużyńska M and Ostrowska-Czubenko J, The effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes. *Prog Chem Appl Chitin Deriv* **15**: 25–32 (2010).
- 34 Tang DW, Yu SH, Ho YC, Huang BQ, Tsai GJ, Hsieh HY, et al., Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and an edible polypeptide. *Food Hydrocolloids* **30**: 33–41 (2013).
- 35 Mady MM and Elshemy WM, Interaction of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) liposomes and insulin. *Mol Phys* **109**: 1593–1598 (2011).
- 36 Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, et al., Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **8**: 2533–2541 (2007).
- 37 Li P, Dai Y-N, Zhang J-P, Wang A-Q and Wei Q, Chitosan–alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *Int J Biomed Sci* **4**: 221–228 (2008).
- 38 Luo Y, Zhang B, Cheng WH and Wang Q, Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydr Polym* **82**: 942–951 (2010).