



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Enrika Celitan

**TRIKOMPONENČIŲ β -KAROTENU ĮKAPSULIUOTŲ DALELIŲ
SINTEZĖ IR TYRIMAS**

**SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF β -CAROTENE LOADED
THREE-COMPONENT PARTICLES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2019

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

Enrika Celitan

**TRIKOMPONENČIŲ β -KAROTENU ĮKAPSULIUOTŲ DALELIŲ
SINTEZĖ IR TYRIMAS**

**SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF β -CAROTENE LOADED
THREE-COMPONENT PARTICLES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

dr. Rūta Gruškienė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

R. Gruš 2019-05-24
(Parašas) (Data)

Konsultantas

doc. dr. Jolanta Sereikaitė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

J. Sereika 2019-05-29
(Parašas) (Data)

Lietuvių kalbos konsultantas

dr. Aušra Žemienė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

A. Žem 2019-05-21
(Parašas) (Data)

Vilnius, 2019

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.
Vilnius

Studentei Enrikai Celitan
(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema: **Trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių sintezė ir tyrimas**

Patvirtinta 2019 m. kovo 19 d. dekanų potvarkiu Nr. 153fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2018 m. gegužės 25 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

1. Nustatyti optimalias β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksų sintezės sąlygas ir paruošti trikomponentes β -karotenu įkapsuliuotas daleles.
2. Išmatuoti trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių dydžius bei zeta potencialus ir įvertinti dalelių stabilumą.
3. Įvertinti β -karoteno stabilumą susintetintose trikomponentėse dalelėse, veikiamose UV šviesa arba karščiu.
4. Nustatyti trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių antioksidacinį aktyvumą.
5. Nustatyti trikomponenčių dalelių spalvų pokyčius saugojimo metu.

Vadovas

.....
(Parašas)
.....
(Parašas)

Konsultantas

dr. Rūta Gruškienė
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

doc. dr. Jolanta Sereikaitė
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)

Enrika Celitan
(Vardas, pavardė)
2017 m. rugsėjo 9 d.
(Data)

Vilniaus Gedimino Technikos Universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-....-....

Antrosios pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos magistro baigiamasis darbas
Pavadinimas **Trikomponenčių beta-karotenu įkapsuliuotų dalelių sintezė ir tyrimas**
Autorius **Enrika Celitan**
Vadovas **dr. Rūta Gruškienė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Magistro darbo metu atlikta β -karoteno ir 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksų sintezė. Gauti kompleksai papildomai dengti skirtingo tipo pektinais: pektino rūgštimi, žemo esterifikacijos laipsnio arba aukšto esterifikacijos laipsnio pektinu. Nustatytas gautų trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių (β -karotenas-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinas-pektinas) ir β -karoteno, esančio dalelėse, veikiamose UV šviesa arba karščiu, stabilumas. Įvertinta, kokią įtaką dalelių dydžiui ir stabilumams turi įtarpos kompleksų dengimui naudojamo pektino tipas, pektinų tirpalų pH bei įtarpos kompleksų koncentracija galutiniame dalelių tirpale. Įtarpos kompleksai ir trikomponentės β -karotenu įkapsuliuotos dalelės charakterizuotos naudojant Ramano arba Furje transformacijos infraraudonųjų spindulių spektrometrinius metodus. Naudojant DPPH metodą nustatytas β -karoteno gebėjimas išlaikyti antioksidacinį aktyvumą jį įkapsuliovus į ciklodekstriną ir gautus kompleksus papildomai padengus pektinu.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, metodinė dalis, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis: 72 p. teksto be priedų, 28 iliustr., 6 lent., 91 bibliografinis šaltinis, 5 priedai.

Prasminiai žodžiai: β -karotenas, 2-hidroksipropil-beta-ciklodekstrinas, įkapsuliavimas, įtarpos kompleksai, pektinas, trikomponentės dalelės

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Master's Graduation Thesis

Title **Synthesis and Investigation of Beta-Carotene Loaded Three-Component Particles**

Author **Enrika Celitan**

Academic supervisor **dr. Rūta Gruškienė**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

In this work, the synthesis of β -carotene and 2-hydroxypropil- β -cyclodextrin inclusion complexes was performed. Prepared complexes were additionally coated using different types of pectin: pectic acid, pectin with low or high esterification degree. The stability of β -carotene, encapsulated into particles, which were exposed to UV light or temperature, and β -carotene loaded three-component particles (β -carotene-2-hydroxypropil- β -cyclodextrin-pectin) was determined. The influence of pectin type, pH of solution and concentration of inclusion complexes on the size, stability of three-component particles and β -carotene was evaluated. Inclusion complexes and β -carotene loaded three-component particles were characterised using Raman or FT-IR spectroscopy methods. Also, using DPPH method the antioxidant activity of encapsulated β -carotene was estimated.

Structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, references.

Thesis consists of: 72 p. text without appendixes, 28 pictures, 6 tables, 91 bibliographical entries, 5 appendixes.

Keywords: β -carotene, encapsulation, 2-hydroxypropil- β -cyclodextrin, inclusion complexes, pectin, three-component particles.

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Enrika Celitan, 20132473

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Nanobiotechnologija, NBTfm-17

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA**

2017 m. liepos 19 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Trikomponenčių beta-karotenu įkapsuliuotų dalelių sintezė ir tyrimas“ patvirtintas 2019 m. kovo 19 d. dekanų potvarkiu Nr. 153fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: docentas daktaras Jolanta Sereikaitė. Mano darbo vadovas daktaras Rūta Gruškienė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs (-usi).



(Parašas)

Enrika Celitan

(Vardas ir pavardė)

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS.....	9
LENTELIŲ SĄRAŠAS	11
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	12
ĮVADAS.....	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. β -Karotenas.....	15
1.1.1. β -Karoteno prigimtis.....	15
1.1.2. Struktūra ir pagrindinės savybės.....	16
1.1.2.1. Šviesos sugertis	17
1.1.2.2. Stabilumas ir tirpumas	17
1.1.2.3. Bioprieinamumas	18
1.1.2.4. Vitamino A aktyvumas	19
1.1.2.5. Antioksidacinis aktyvumas	20
1.1.3. β -Karoteno nauda sveikatai	22
1.2. β -Karoteno įkapsuliavimo metodai.....	23
1.2.1. Įtarpos kompleksų sintezė.....	24
1.2.2. Kietų lipidų nanodalelės	26
1.2.3. Purškiamas džiovinimas	27
1.2.4. Mikro- ir nanoemulsijos	29
1.2.5. Kiti įkapsuliavimo metodai.....	30
2. METODINĖ DALIS	34
2.1. Medžiagos ir prietaisai.....	34
2.1.1. Medžiagos.....	34
2.1.2. Prietaisai.....	34
2.1.3. Kompiuterinės programos	36
2.2. Metodai	36
2.2.1. β -Karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksų sintezė.....	36
2.2.2. Įtarpos kompleksų papildomas dengimas pektinu.....	36
2.2.3. β -Karoteno koncentracijos nustatymas.....	37

2.2.3.1.	Ultravioletinės-regimosios šviesos spektroskopija	37
2.2.3.2.	Atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografija	37
2.2.4.	Stabilumo tyrimai	38
2.2.4.1.	Dinaminės šviesos sklaidos ir zeta potencialo matavimai	38
2.2.4.2.	Poveikis ultravioletine šviesa	39
2.2.4.3.	Terminis stabilumas	39
2.2.5.	Spalvos matavimas	39
2.2.6.	Antioksidacinis aktyvumas	40
2.2.7.	Spektroskopinė analizė	41
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	42
3.1.	Įtarpos kompleksų sintezės sąlygų optimizavimas	42
3.1.1.	β -Karoteno koncentracijos nustatymas įtarpos kompleksuose	42
3.1.2.	β -Karoteno tirpiklio ir sintezės temperatūros parinkimas įtarpos kompleksų sintezei.....	44
3.1.3.	Ciklodekstrino koncentracijos vandeniniame tirpale įtaka įtarpos kompleksų sintezei.....	45
3.1.4.	Įtarpos kompleksų charakterizavimas.....	47
3.2.	Trikomponenčių dalelių tyrimai	47
3.2.1.	Ciklodekstrino koncentracijos įtaka dalelių dydžiui ir β -karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse, stabilumui	48
3.2.2.	Trikomponenčių dalelių stabilumas ir charakterizavimas	51
3.2.3.	Veikimas ultravioletine šviesa	54
3.2.4.	Terminis poveikis	57
3.3.	Antioksidacinio aktyvumo tyrimai	60
3.4.	Spalvos matavimai.....	62
	IŠVADOS	64
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	65

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. A – α -karotenas; B – β -karotenas; C – likopenas; D – liuteinas; E – zeaksantinas; F – β -kriptoksantinas (Prakash and Gupta, 2014).....	15
2 pav. β -Karoteno, ištirpinto n-heksane, cikloheksane arba benzene, UV-Vis spektrai (Fuciman et al., 2010)	17
3 pav. β -Karoteno konversija į dvi retinolio molekules (Hurst, 2002).....	20
4 pav. β -Karoteno biologinės funkcijos ir lėtinių ligų riziką mažinantis poveikis (A. Rao and L. G. Rao, 2004)	22
5 pav. Ciklodekstrino įtarpos kompleksų formavimosi schema (Mura, 2014)	24
6 pav. KLN, kurioje įkapsuliuota lipofilinė bioaktyvi medžiaga, stabilizuota PAM sluoksniu (Weiss et al., 2008).....	26
7 pav. Purškiamu dengimu gaunama kapsulė (Naz and Sulaiman, 2016).....	28
8 pav. Mikroemulsijos ir nanoemulsijos lašeliai (McClements, 2012)	29
9 pav. Galima trikomponenčių dalelių sintezės schema.....	42
10 pav. A – gryno β K, B – β K, išekstrahuoto iš įtarpos kompleksų, susintetintų naudojant 5 % HCD tirpalą ir acetonių β K tirpalą, chromatogramos	44
11 pav. β K-HCD, susintetintų naudojant 0,5; 5; 25 arba 50 % HCD tirpalus, UV-Vis spektrai ir kompleksų vandeninių tirpalų spalvos	46
12 pav. β K, esančio β K-HCD, gautuose naudojant 25 arba 50 % HCD tirpalą, santykinis stabilumas saugojimo metu 4 °C, kambario ir 37 °C temperatūroje po 1, 4, 8, 14 ir 28 dienų.....	46
13 pav. HCD (A), gryno β K (B) ir β K-HCD (C) Ramano spektrai	47
14 pav. Pektino molekulė (Raj et al., 2012)	48
15 pav. Trikomponenčių dalelių, gautų žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalu (pH 4, 5, 6, 7) dengiant β K-HCD, susintetintus naudojant 25 arba 50 % HCD tirpalus, dydžiai. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20, 30 arba 50 mg/mL.....	49
16 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalu (pH 4, 5, 6, 7) dengiant β K-HCD, susintetintus naudojant 25 (mėlyna spalva) arba 50 % (raudona) HCD tirpalą, santykinis stabilumas veikiant UV šviesa. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 mg/mL	50
17 pav. HCD (A), pektino rūgštis (B), liofilizuotų β K-HCD (C), trikomponenčių dalelių (D) ir β K FT-IR spektrai.....	51

18 pav. β K-HCD, trikomponenčių dalelių (AEL) ir aukšto esterifikacijos laipsnio pektino dydžių pasiskirstymas. β K-HCD koncentracija galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale yra 20 mg/mL	52
19 pav. Trikomponenčių β K įkapsuliuotų dalelių, gautų β K-HCD dengiant pektinų tirpalais (pH 4, 5, 6, 7), dydžiai pradinio matavimo metu ir po mėnesio. β K-HCD koncentracija galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL	53
20 pav. Trikomponenčių β K įkapsuliuotų dalelių, gautų β K-HCD dengiant pektinų tirpalais (pH 4, 5, 6, 7), zeta potencialai pradinio matavimo metu ir po mėnesio. β K-HCD koncentracija galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale yra 20 mg/mL	54
21 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant pektinų tirpalais (pH 6), arba β K-HCD, santykis stabilumas, daleles veikiant UV šviesa. β K-HCD koncentracija galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale yra 20 mg/mL	55
22 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo ir pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, santykinis stabilumas, daleles veikiant UV šviesa. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL	56
23 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo ir pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, santykinis stabilumas, daleles veikiant 60 °C temperatūra. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL	58
24 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo ir pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, santykinis stabilumas, daleles veikiant 95 °C temperatūra. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL	59
25 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse (ŽEL), gautose β K-HCD dengiant skirtingo pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo trikomponenčių dalelių koncentracijos tiriamajame tirpale	61
26 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo pektino tirpalais (pH 4), arba β K-HCD kompleksuose, antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo tikslinių dalelių koncentracijos tiriamajame tirpale	61
27 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo pektino tirpalais (pH 4), arba β K-HCD kompleksuose, antioksidacinio aktyvumo kitimas saugojimo metu	62
28 pav. Trikomponenčių dalelių, gautų β K-HCD dengiant skirtingo tipo pektino tirpalais (pH 4), arba β K-HCD kompleksų spalvos prisotinimo ir spalvų skirtumo kitimas saugojimo metu	63

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. β -Karoteno savybės (Gul et al., 2015)	16
2 lentelė. α -, β - ir γ -ciklodekstrinų savybės (Mura, 2014)	25
3 lentelė. Įkapsuliavimo metodai (Santos and Mereiles, 2010).....	31
4 lentelė. β K ekstrakcijos būdai.....	43
5 lentelė. β K koncentracija β K-HCD, sintezei naudojant skirtingus β K tirpiklius. Įtarpos kompleksų sintezei naudotas 5 % HCD tirpalas.....	45
6 lentelė. β K koncentracija β K-HCD tirpaluose, sintezę atliekant skirtingose temperatūrose. Įtarpos kompleksų sintezei naudotas 5 % HCD tirpalas ir acetoninis β K tirpalas	45

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ABTS – 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis
AEL – trikomponentės β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino-aukšto esterifikacijos laipsnio pektino dalelės
AMD – amžinė makulos degeneracija
AscP – amilozės-askorbilo palmitatas
CD – ciklodekstrinas
DLS – dinaminė šviesos sklaida
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas
FRAP – geležies jonų redukcijos antioksidacinė galia
FT-IR – Furje transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija
GA – gumiarabikas
HCD – 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinas
KLN – kietų lipidų nanodalelės
LDL – lipoproteinai
MA – maltodekstrinas
MK – modifikuotas krakmolas
NLN – nanostruktūrizuoti lipidų nešėjai
ORAC – deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas
PAM – paviršinio aktyvumo medžiagos
RG – trikomponentės β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino-pektino rūgšties dalelės
RNS – reaktyvios azoto formos
ROS – reaktyvios deguonies formos
RP-HPLC – atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografija
RSA – antioksidacinis aktyvumas
TEAC – standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentas
UV – ultravioletinė šviesa
UV-Vis – ultravioletinės-regimosios šviesos spektroskopija
ŽEL – trikomponentės β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino-žemo esterifikacijos laipsnio pektino dalelės
 β K – β -karotenas
 β K-HCD – β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksai

IVADAS

Karotinoidai – tai spalvoti riebaluose tirpūs pigmentai, randami natūralioje gamtoje. Šie pigmentai ne tik suteikia spalvą tam tikriems gyvūnams, augalams bei mikroorganizmams, bet atlieka ir svarbias, kartais net kritines funkcijas biologinėse sistemose (Young and Lowe, 2018). Vienas iš svarbiausių, žmogaus organizme randamų, karotinoidų yra β -karotenas.

Žmogaus organizme kepenyse β -karotenas yra konvertuojamas į vitaminą A, kuris reikalingas palaikyti normalią metabolizmo, akių, širdies ir kraujagyslių veiklą. Taip pat vartojant pakankamas β -karoteno dozes jis apsaugo ląsteles nuo oksidacinio streso ir veikia kaip potencialus profilaktinis bei terapinis agentas daugumos ligų (regėjimo, autoimuninių sutrikimų, odos ligų, diabeto, vėžinių susirgimų ir kitų) prevencijoje (Milani, Basirnejad, Shahbazi and Bolhassani, 2016).

Nepaisant β -karoteno privalumų jis pasižymi blogu tirpumu vandenyje, yra jautrus šviesai, temperatūrai ir deguoniui, todėl yra chemiškai nestabilus. Taip pat dėl β -karoteno baltymų kompleksų susidarymo, augalų ląstelių sienelių atsparumo virškinimui ir degradacijai nepasiekiamas visiškas β -karoteno atpalaidavimas, todėl maksimali jo absorbcija iš natūralių šaltinių yra tik apie 65 % ir suvartojamo kiekio neužtenka pasiekti dienos normos (2–4 mg/mL). Visos šios savybės riboja jo pritaikymą maisto, farmacijos ir kosmetikos pramonėje, todėl kuriami ir tiriami įvairūs β -karoteno įkapsuliavimo būdai (Moraes et al., 2013; Donhowe and Kong, 2014).

Hidrofobinių junginių, tokių kaip β -karotenas, įkapsuliavimui naudojami įvairūs metodai, vienas iš jų yra įtarpos kompleksų sintezė. Įtarpos kompleksų sintezei plačiai naudojami ciklodekstrinai ir modifikuoti jų dariniai, tokie kaip 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinas, kurie pasižymi geresniu tirpumu vandenyje. β -Karoteną įterpus į 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino molekulės hidrofobinę vidinę ertmę pagerinamas jo tirpumas, cheminis stabilumas ir bioprieinamumas (Kaur, Bawa and Singh, 2016). Papildomas būdas pagerinti β -karoteno stabilumą ir praplėsti jo panaudojimo galimybes gali būti β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksų dengimas natūraliai gamtoje egzistuojančiu anijoniniu polisacharidu – pektinu, kuris naudojamas kaip dengianti medžiaga ir kituose kapsuliavimo methoduose, pavyzdžiui, purškiamame džioviniame (Liu, 2014).

Darbo tikslas – susintetinti trikomponentes β -karotenu įkapsuliuotas daleles, atlikti gautų dalelių bei jose esančio β -karoteno savybių ir stabilumo tyrimus.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti optimalias β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksų sintezės sąlygas ir paruošti trikomponentes β -karotenu įkapsuliuotas daleles.

2. Išmatuoti trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių dydžius bei zeta potencialus ir įvertinti dalelių stabilumą.
3. Įvertinti β -karoteno stabilumą susintetintose trikomponentėse dalelėse, veikiamose UV šviesa arba karščiu.
4. Nustatyti trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių antioksidacinį aktyvumą.
5. Nustatyti trikomponenčių dalelių spalvų pokyčius saugojimo metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

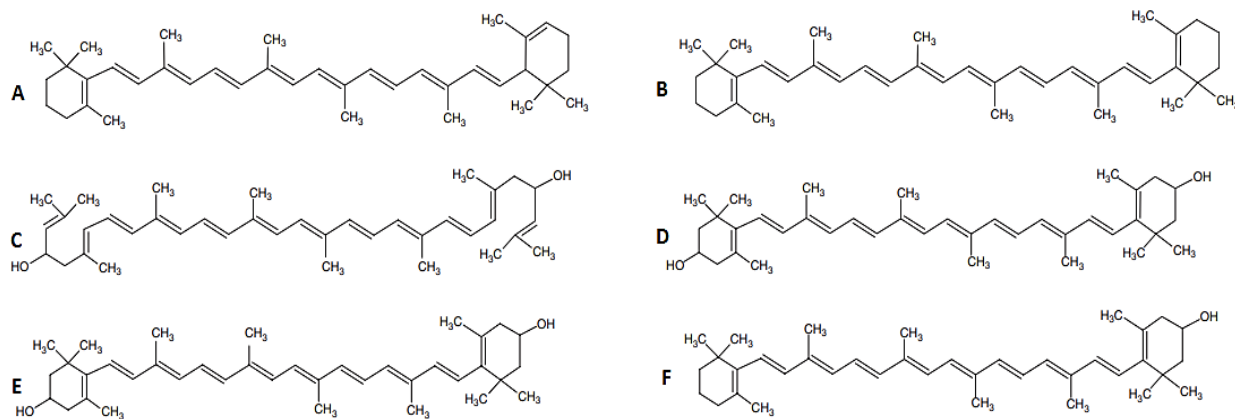
1.1. β -Karotenai

1.1.1. β -Karoteno prigimtis

Karotinoidai – tai organiniai geltonos, oranžinės ir raudonos spalvos pigmentai, randami augalų chloroplastuose bei kituose fotosintetinančiuose organizmuose, pavyzdžiui, dumbliuose, kai kuriuose bakterijose ir grybuose (Gul et al., 2015). Šiai pigmentų grupei priklauso daugiau nei 700 fitocheminių medžiagų, iš kurių tik apie 24 yra randamos žmogaus vartojamuose maisto produktuose (Prakash and Gupta, 2014). Karotinoidai yra klasifikuojami į dvi pagrindines grupes:

- a) karotenai, sudaryti tik iš vandenilio ir anglies atomų (pavyzdžiui, α -karotenai, β -karotenai, likopenai);
- b) oksikarotinoidai (arba ksantofilai), sudaryti iš vandenilio, anglies ir deguonies atomų (pavyzdžiui, liuteinai ir zeaksantinai) (Gul et al., 2015).

Labiausiai išnagrinėti karotinoidai yra α -karotenai (1 pav. A), β -karotenai (1 pav. B), likopenai (1 pav. C), liuteinai (1 pav. D) ir zeaksantinai (1 pav. E). Maisto produktuose daugiausia randami karotinoidai yra β -karotenai, likopenai, liuteinai bei β -kriptoksantinai (1 pav. F) (Prakash and Gupta, 2014).



1 pav. A – α -karotenai; B – β -karotenai; C – likopenai; D – liuteinai; E – zeaksantinai; F – β -kriptoksantinai (Prakash and Gupta, 2014)

Svarbiausiu karotinoidu žmogaus mityboje laikomas β -karotenai (β K), kuris iš visų karotinoidų pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu ir yra pagrindinis vitamino A šaltinis žmonėms (Gul et al., 2015). Šio karotino randama daugelyje daržovių ir vaisių: morkose, moliūguose, saldžiosiose bulvėse, paprikose, brokoliuose ir kitose oranžinės bei tamsios žalios spalvos daržovėse bei vaisiuose (Kaur et al., 2016; Gul et al., 2015).

1.1.2. Struktūra ir pagrindinės savybės

β -Karoteną sudarytas iš aštuonių „uodega-uodega“ arba „galva-uodega“ ryšiais sujungtų izopreno (2-metil-1,3-butadieno) vienetų, kurie abiejuose grandinės galuose yra ciklizuoti ir sudaro β -jonono žiedus. Taip susijungę izoprenai formuoja simetrišką konjuguotų dvigubųjų ryšių grandinę. Tokia β -karoteno struktūra lemia fizikines, chemines bei biologines jo savybes (Stoker, 2012). Pagrindinės β K savybės pateiktos 1 lentelėje.

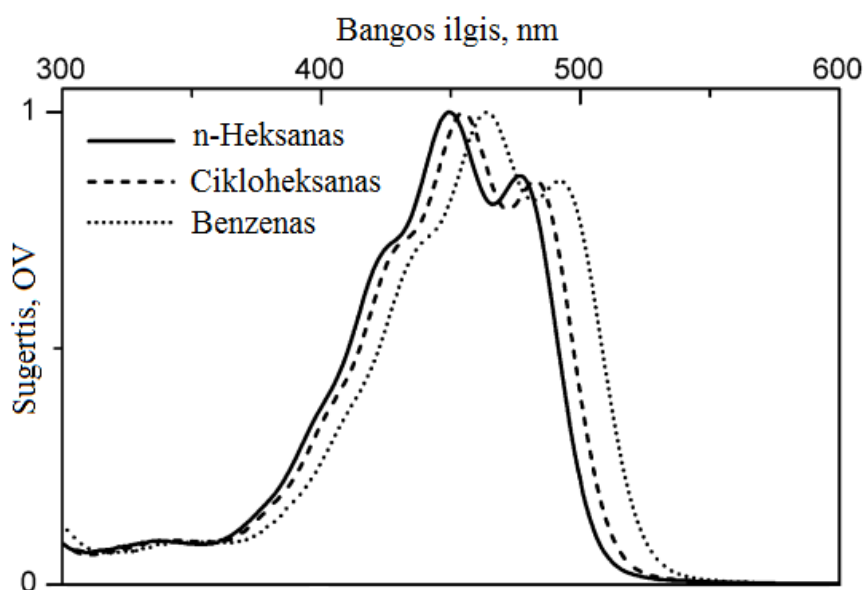
1 lentelė. β -Karoteno savybės (Gul et al., 2015)

Nr.	Savybė	Apibūdinimas
1	β-Karoteno struktūra	
	Molekulinė formulė	$C_{40}H_{56}$
	Molekulinė masė	536,9 g/mol
	Dvigubieji ryšiai	11
	β -Jonono žiedas	Yra
	Tirpumas	Blogas tirpumas vandenyje, pasižymi lipofiliškumu
2	Funkcijos	
	Antioksidacinės savybės	Taip
	Vitamino A aktyvumas	Taip
	Imuninė funkcija	Sustiprinta
	Ląstelės ciklo progresija	Netiesiogiai slopina
	Karcinogenų metabolizmas	Gali moduluoti
	Gyvūnų vėžio tyrimai	Antivėžinis
3	Šaltiniai	
	Maisto produktai	Tamsiai žalios, geltonos ir oranžinės daržovės ir vaisiai, raudonųjų palmių aliejus, maistiniai dažikliai ir kiti
	Papildai	Multivitaminai, viensaltiniai papildai, maistas ir gėrimai
4	Metabolizmas	
	Bioprieinamumas	Mažas prieinamumas iš žalių daržovių ir morkų; gerina riebalai ir terminis apdorojimas; labai geras iš papildų
	Izomerizacija	<i>Trans</i> -izomerai
	Sankaupos	Randamas visuose audiniuose, ypač antinksčių liaukose
	Pagrindinė saugojimo vieta	Riebalinis audinys ir kepenys
	Cirkuliavimo pusamžis	< 12 dienų
	Koncentracija plazmoje	Priklauso nuo įvairių veiksnių: mitybos, lipoproteinų koncentracijos, riebumo, rūkymo ir kitų

β K šviesos sugerties, stabilumo ir tirpumo, bioprieinamumo, vitamino A ir antioksidacinio aktyvumo savybės plačiau aptartos 1.2.1.–1.2.5. skyriuose.

1.1.2.1. Šviesos sugertis

Dėl konjuguotų dvigubųjų ryšių sistemos karotinoidai šviesą sugeria 400–500 nm bangų ilgyje, todėl jie yra geltonos, oranžinės arba raudonos spalvos. Maksimali sugertis priklauso nuo dvigubų ryšių kiekio molekulėje. Karotinoidų ultravioletinės-regimosios (UV-Vis) šviesos spektrai gali būti naudojami specifinių karotinoidų identifikavimui (Van den Berg et al., 2000; Hurst, 2002). β K priklausomai nuo naudojamo tirpiklio šviesą absorbuoja 445–455 nm bangų ilgyje (2 pav.) (Fuciman et al., 2010).



2 pav. β -Karoteno, ištirpinto n-heksane, cikloheksane arba benzene, UV-Vis spektrai (Fuciman et al., 2010)

Sugertis UV-Vis šviesos srityje vyksta dėl elektronų perėjimo iš mažiausio energijos lygmens į aukštesnius sužadavimo lygmenis. Šis mechanizmas susijęs su β K antioksidacinėmis savybėmis (Britton, 1995).

1.1.2.2. Stabilumas ir tirpumas

Iš esmės β K sudaro *trans*-izomerai ir tik mažesnis kiekis *cis*-izomerų (*trans*- β -karotenas > 9-*cis*- β -karotenas > 13-*cis*- β -karotenas > 15-*cis*- β -karotenas). Dėl didelio dvigubųjų ryšių kiekio β K molekulėje *trans*- β -karoteno izomerai yra labai nestabilūs ir jautrūs degradacijai bei oksidacijai, todėl terminės ir cheminės oksidacijos, izomerizacijos bei fotosensibilizacijos metu, kontaktuojant su deguonimi, šviesa arba aukšta temperatūra apdorojimo ir saugojimo metu, jie lengvai izomerizuojasi į *cis*-izomerus arba oksiduojasi į epoksikarotinoidus ar apokarotenalius. Dėl struktūros pokyčių stebimas β K spalvos intensyvumo pokytis ir

antioksidacinio aktyvumo mažėjimas (D. Dutta, A. Dutta, Raychaudhuri and Chakraborty, 2006; Penicaud, Achir, Dhuique-Mayer, Dornier and Philippe, 2011; Gul et al., 2015).

β K molekulės grandinė sudaryta tik iš anglies ir vandenilio atomų, todėl ji yra nepolinė ir pasižymi stipriu lipofiliškumu. Dėl šių grandinės savybių β K netirpsta vandeninėje terpėje ir jo panaudojimas yra ribotas (Latowski, Szymanska and Strzalka, 2014).

1.1.2.3. Bioprieinamumas

Bioprieinamumas – tai suvartotos maistinės medžiagos dalis, kuri yra absorbuojama, metabolizuojama ir patenka į kraujotakos sistemą (Gul et al., 2015). Karotinoidų bioprieinamumas nustatomas po suvartojimo matuojant jų koncentraciją kraujo serume arba plazmoje. Plazmoje esantys karotinoidai sudaro apie 1 % visų organizme esančių karotinoidų, o didžiausia jų koncentracija randama kepenyse (Schmitz, Poor, Wellman and Erdman, 1991). Karotinoidų bioprieinamumo nustatymui taip pat gali būti naudojamas balanso metodas, radioaktyvaus β K kiekio matavimas limfoje, žymėto β K panaudojimas ir kiti metodai (Castenmiller and West, 1998).

Galima išskirti tris β K absorbavimo etapus. Pirmas etapas yra β K atpalaidavimas iš maisto matricos, vykstantis burnoje kramtymo metu veikiant fermentui amilazei, todėl didžiausią įtaką bioprieinamumui turi maisto matrica ir jos apdorojimas (Haskell, 2012). Bioprieinamumą pagerina mechaninis maisto apdorojimas – sumažėjus dalelių dydžiui padidėja paviršiaus, kuris gali kontaktuoti su skrandžio rūgštimis (pepsinu), plotas. Pavyzdžiui, atlikus morkų homogenizavimą β K atpalaidavimas *in vitro* padidėja 18 % lyginant su žaliomis gabaliukais supjaustytomis morkomis (Hedren, Diaz and Svanberg, 2002). Terminis apdorojimas, pavyzdžiui, kepimas ar virimas, pagerina β K bioprieinamumą dėl karoteno-baltymų kompleksų degradacijos. Žalias morkas bei špinatus termiškai apdorojus 121 °C temperatūroje 40 minučių, β K koncentracija kraujo plazmoje *in vivo* padidėja apie 3 kartus, lyginant su neapdorotomis daržovėmis (Rock et al., 1998). Taip pat atlikti tyrimai rodo, kad terminis apdorojimas bioprieinamumą pagerina daugiau nei mechaninis. Po β -karoteno atpalaidavimo iš maisto matricos vyksta virškinimo etapas, kurio metu jis ištirpsta aliejaus fazėje – tam reikalingas tiesioginis kontaktas tarp aliejaus ir karoteno, todėl svarbus pilnas β K atpalaidavimas iš maisto matricos. Trečias etapas yra mišrių micelių susidarymas. Aliejaus fazėje esančio β K perėjimas į plonąją žarną skatina tulžies druskų, kurios padeda susidaryti mišrioms micelėms, atpalaidavimą. Tulžies druskos elgiasi kaip paviršinio aktyvumo medžiagos (PAM) ir padeda iš emulsijos formuoti micelėms, kurių vidutinis diametras yra 80 Å. Šios micelės yra sudarytos iš β K, laisvų riebalų rūgščių, monogliceridų ir fosfolipidų. Vienas svarbiausių faktorių micelių formavimui yra riebalų vartojimas kartu su maistu, nes lipidai reikalingi ne tik β -karoteno įterpimui į micleles,

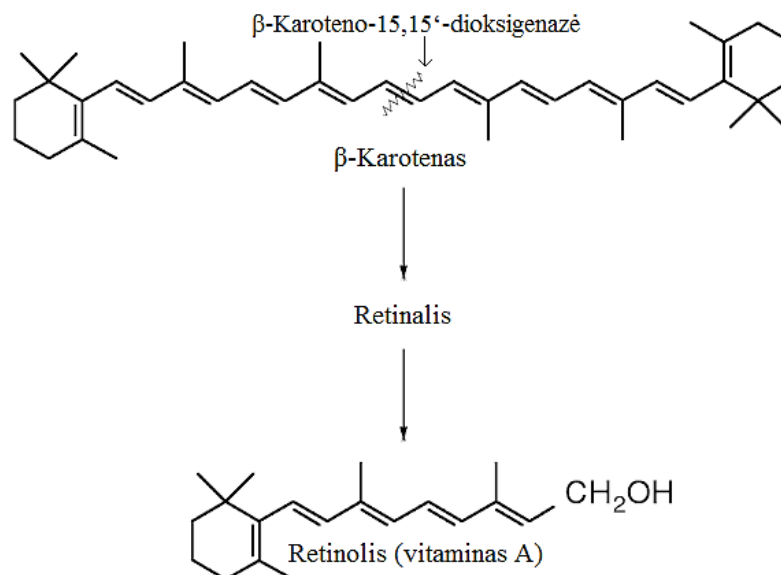
bet ir tulžies druskų atpalaidavimui. Paskutiniame etape β K kontaktuoja su žarnų epitelio ląstelėmis ir vyksta jo absorbuojimas į citozolį arba plazmos membraną. Po absorbuojimo, prieš patenkant į limfinę bei kraujotakos sistemą, β K yra įterpiamas į chilomikronus (Donhowe and Kong, 2014; Rodriguez-Amaya, 2010).

β -karoteno bioprieinamumui įtaką taip pat daro tokie veiksniai, kaip β K izomerinė forma (*trans*- β -karotenas žmogaus organizme įsisavinamas greičiau), β K kiekis suvartojamuose maisto produktuose, kitų karotinoidų kiekis, suvartojamų riebalų kiekis, alkoholio vartojimas, papildų vartojimas, rūkymas, taip pat genetiniai faktoriai, lytis, amžius ir visų šių veiksnių tarpusavio sąveika (Castenmiller and West, 1998; Haskell, 2012; Gul et al., 2015).

1.1.2.4. Vitamino A aktyvumas

Vitamino A aktyvumu pasižymi karotinoidai, kurie turi bent vieną ne hidroksilintą β -jonono žiedą (Bogacz-Radomsk and Harasym, 2018). Iš daugiau nei 700 karotinoidų vitamino A aktyvumu pasižymi tik apie 50. Didžiausią vitamino A aktyvumą turi *trans*- β -karotenas, nes vykstant centriniam fermentiniam jo molekulės skilimui teoriškai gaunamos dvi vitamino A molekulės (Hurst, 2002). Tačiau, atlikti tyrimai rodo, kad net β K konversija į vitaminą A nevyksta taip efektyviai – konversijos santykis yra 6:1, o tai reiškia, kad 6 mg β K yra ekvivalentiški 1 mg retinolio (Bogacz-Radomsk and Harasym, 2018; Eitenmiller, Landen and Ye, 2007). Nekonvertuoto β K dalis yra įterpiama į chilomikronus. Pagrindiniai veiksniai, darantys įtaką β K biokonversijai į vitaminą A, yra maisto matricos savybės, apdorojimas ir riebalų kiekis mityboje. Taip pat atlikti tyrimai rodo, kad vartojant mažesnę β K dozę (6 mg β K turinčias aliejines kapsules) gaunamas apie 14,5 karto didesnis biokonversijos į vitaminą A santykis (3,8:1), nei vartojant apie 20 kartų didesnę dozę (55:1) (Tang, 2010).

Karotinoidų konversija į vitaminą A gali vykti dviem būdais: vykstant centriniam arba ekscentriniam molekulės skilimui. Dažniausiai β K į vitaminą A konvertuojamas vykstant centriniam skilimui, katalizuojamam citozolinio fermento β -karoteno-15,15'-dioksigenazės (EC 1.13.11.21), esančio plonosios žarnos gleivinėje. Reakcijos metu skyla centrinis 15,15' β -karoteno dvigubasis ryšys ir gaunamas retinalis – tiesioginis retinolio (vitamino A) arba retinoinės rūgšties pirmtakas (3 pav.) (Harrison, 2012; Olson, 1989).



3 pav. β-Karoteno konversija į dvi retinolio molekules (Hurst, 2002)

Žmogaus organizmas pats nesintetina vitamino A, todėl karotinoidai yra pagrindinis jo šaltinis žmonėms (Tee, 1995). Vitaminas A reikalingas palaikyti normalią augimo ir regos funkciją, embrioninį vystymąsi, epitelinių ląstelių diferenciaciją, stiprina imuninę sistemą, palaiko normalią žarnyno ir reprodukcinės sistemos veiklą (Gul et al., 2015). Išsivysčiusiose šalyse daržovėse ir vaisiuose esantys karotinoidai, tokie kaip βK, sudaro apie 70 % per dieną gaunamo vitamino A (Tang, 2010).

1.1.2.5. Antioksidacinis aktyvumas

Dėl savo labai reaktyvios elektronais praturtintos konjuguotų dvigubųjų ryšių sistemos βK pasižymi antioksidacinėmis savybėmis – gali veikti kaip laisvųjų peroksilo radikalų arba vienetinio molekulinio deguonies gaudyklė (Kiokias and Gordon, 2004; Stahl and Sies, 2004; Tee, 1995). Antioksidantai žmogaus organizme sudaro sudėtingą daugiakomponentinę gynybinę sistemą, kuri užtikrina reaktyvios deguonies formos (ROS), reaktyvios azoto formos (RNS) radikalų ir neradikalų sujungimą, modifikaciją, slopinimą arba ardymą. Nepakankamas kiekis antioksidantų gali sukelti oksidacinį stresą, pažeisti ląstelės struktūrą ir funkcijas (Šalkauskas, 2015). Antioksidacinio aktyvumo nustatymui naudojami 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH), geležies jonų redukcijos antioksidacinės galios tyrimo (FRAP), standartinio antioksidanto trolokso ekvivalento (TEAC), 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS), deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymo (ORAC) ir kiti metodai (Moharram and Youssef, 2014).

A) Radikalų gaudyklė

Peroksilo radikalas ($\text{ROO}^\bullet$) jungiasi prie βK dvigubąjo ryšio (1 reakcija), o susidaręs centrinės anglies radikalas ($\text{ROO-}\beta\text{K}^\bullet$) greitai grįžtamai reaguoja su deguonimi ir

suformuojamas naujas, grandinę nešantis peroksilo radikalas (ROO-βK-OO•) (2 reakcija). Sumažėjus deguonies slėgiui 2 reakcijos pusiausvyra persikelia į kairę pusę, kad būtų sumažinama peroksilo radikalų koncentracija ir autooksidacijos apimtis sistemoje. Be to, karoteno-radikalo aduktas taip pat gali būti suardomas jam reaguojant su kitu peroksilo radikalu. Ši reakcija vyksta esant mažiems deguonies slėgiams (Kiokias and Gordon, 2004; Stahl and Sies, 2004; Terao, 1989). Atlikti tyrimai rodo, kad deguonies slėgį pakėlus iki 8 mm Hg βK antioksidacinės savybės (lipidų oksidacijos slopinimas) sumažėja apie 20 %, lyginant su žemais slėgiais. Panašus efektas stebimas esant didelėms βK koncentracijoms (> 5 mM) – tada jis pasižymi labiau prooksidacinėmis nei antioksidacinėmis savybėmis (Kiokias and Gordon, 2004; Stahl and Sies, 2004; Van den Berg et al., 2000).

B) Vienetinio deguonies gaudyklė

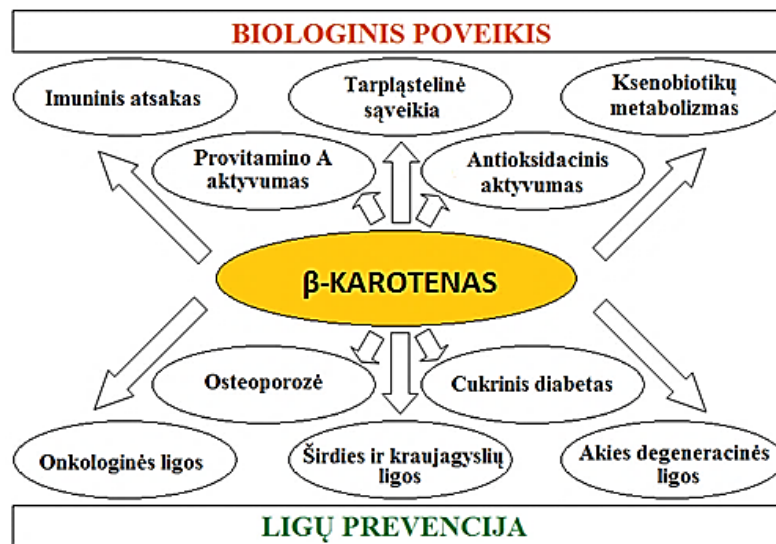
Vienetinis deguonis pirmiau perneša mainų energiją, kad βK molekulė pasiektų tripletinę būseną (³β-karotenas*), o tada grįžta į pagrindinę energijos būseną ir yra inaktyvuojamas. Energijos pernaša iš vienetinio deguonies karotenui vyksta pagal elektronų pernašos mainų mechanizmą. Tripletinėje būsenoje esantis βK atpalaiduoja energiją šilumos pavidalu ir grįžta į savo pagrindinę energijos būseną. Tokiu būdu βK veikia taip efektyviai, kad viena jo molekulė geba sugaudyti net iki 1000 vienetinio deguonies molekulių (Kiokias and Gordon, 2004).

C) Sąveika su kitais antioksidantais

Tiriant antioksidantų tarpusavio sąveikas ir jų poveikį nustatyta, kad tam tikrų antioksidantų kombinacijos nuo oksidacinio streso apsaugo stipriau nei atskiri antioksidantai. *In vitro* tyrimų metu nustatyta, kad β-karotenas ne tik sugeba sugaudyti oksiradikalus, bet ir regeneruoti α-tokoferolį iš jo radikalo (Kiokias and Gordon, 2004; Stahl and Sies, 2004). Įrodymą, kad β-karotenas gali sinergetiškai sąveikauti su α-tokoferoliu, pirmą kartą pateikė Palozza ir jo komanda. Tyrimams naudojant membranos modelį nustatyta, kad lipofilinių βK ir α-tokoferolio antioksidantų kombinacija lipidų peroksidaciją slopina efektyviau nei atskiri antioksidantai (Palozza and Krinsky, 1992). Naudojant antioksidantų kombinacijas žmogaus fibroblastų kultūroje pastebėtas sinergetinis poveikis prieš ultravioletinės šviesos sukeltą fotooksidacinį stresą (Bohm, Edge, Lange and Truscott, 1998^A). *In vivo* ir *in vitro* tyrimų metu nustatyta, kad naudojant βK, vitaminų E ir C kombinaciją ląstelės apie 5 kartus labiau apsaugomos nuo NO₂ sukulto oksidacinio streso, lyginant su vieno βK poveikiu (Bohm, Edge, McGarvey and Truscott, 1998^B).

1.1.3. β -Karoteno nauda sveikatai

Iš β K konversijos būdu gaunamas vitaminas A, kuris svarbus embrioniniam vystymuisi, normalioms augimo ir regos funkcijoms. β K taip pat laikomas kelių tam tikrų genų slopintoju ir netgi pasižymi priešvėžinėmis savybėmis bei apsaugo ląsteles nuo oksidacinio streso. Taip pat, β K yra vertingas priedas dėl savo spalvinių savybių, naudojamas maisto, farmacijos ir kosmetikos pramonėje (Bogacz-Radomsk and Harasym, 2018). β K vartojimas pakankamais kiekiais padeda išvengti vėžio (slopiną piktybinių ląstelių proliferaciją), širdies ir kraujagyslių ligų, aterosklerozės, diabeto, kataraktos ir kitų, dažniausiai su amžiumi susijusių, ligų. Taip pat jis pasižymi imunomoduliaciniu aktyvumu – padeda sustiprinti imuninę sistemą ir lengviau įveikti infekcijas bei uždegimus (Kaur et al., 2016). β -Karoteno pagrindinės biologinės funkcijos bei tam tikrų ligų riziką mažinantis poveikis pateiktas 4 paveiksle.



4 pav. β -Karoteno biologinės funkcijos ir lėtinių ligų riziką mažinantis poveikis (A. Rao and L. G. Rao, 2004)

Atlikti tyrimai *in vivo* rodo, kad β K mažina ultravioletinės šviesos sukeliama odos vėžio bei dimetilbenzatraceno sukeliama burnos karcinomų riziką (Gul et al., 2015). Taip pat *in vitro* tyrimų metu nustatyta, kad β K slopina MCF-7 ir Hs578T žmogaus krūties vėžio ląstelių augimą (Chew and Park, 2004).

β -Karoteno gebėjimas sugauti laisvuosius radikalus padidina mažo tankio lipoproteinų (LDL) atsparumą oksidacijai, taip sumažinant aterosklerozės ir vainikinių arterijų ligų riziką. Nustatyta, kad pacientams, kasdien tris savaites vartojusiems po 15 mg β K, LDL- β -karoteno kompleksų kiekis padidėja apie 11–12 kartų bei stebimas stiprus LDL oksidacijos slopinimas (Dugas, Morel and Harrison, 1999).

Pool-Zobel'is ir jo komanda atlikto tyrimą, kurio metu 23 sveiki nerūkantys vyrai nuo 27 iki 40 metų amžiaus pirmas dvi savaites laikėsi žarnyno valymo dietos. Po 2 savaičių jie

kasdien gaudavo 40 mg likopeno (3–4 savaitė), 22,3 mg β K ir 15,7 mg α -karoteno (5–6 savaitė) ir 11,3 mg liuteino (7–8 savaitė). Kiekvieną savaitę iš pacientų buvo imamas kraujas ir įvertinamos DNR pažaidos vienos ląstelės gelio elektroforezės metodu. Nustatyta, kad karotinoidų vartojimas stipriai sumažina endogeninių limfocitų DNR grandinės pažaidų lygį (Pool-Zobel, Bulb, Muller, Wollowski and Rechkemmer, 1997).

Karotinodai taip pat apsaugo nuo žalingų saulės spindulių ir ultravioletinės šviesos indukuotos eritemos formavimosi. Atliktame tyrime lygintas β K (24 mg per dieną) ir karotinoidų mišinio (β K, liuteino ir likopeno, 8 mg per dieną kiekvieno) apsauginis poveikis nuo eritemos. 12 savaitių trukusiame tyrime dalyvavo trys grupės savanorių, turinčių sausą odą – placebo grupė, β -karoteną vartojanti grupė ir karotinoidų mišinį vartojanti grupė. 24 valandas prieš ir po apšvietimo dirbtine saulės šviesa bei po 6 ir 12 savaitių gydymo įvertintas eritemos intensyvumas. Gauti rezultatai rodo, kad kontrolinėje grupėje neįvyko jokie pokyčiai, o abejose pacientų, vartojančių karotinoidus, grupėse po 24 valandų pastebėtas eritemos intensyvumo sumažėjimas (Heinrich et al., 2003).

Tirtas antioksidantų (vitamino C, vitamino E ir β K) ir jų kombinacijos su cinku poveikis amžinės makulos degeneracijai (AMD). Iš viso tyrime dalyvavo 3640 žmonių nuo 55 iki 80 metų amžiaus. Gauti rezultatai rodo, kad antioksidantų ir cinko vartojimas stipriai sumažina AMD riziką (AEDSRG, 2001).

β -Karotenas pasižymi įvairiomis, žmogaus sveikatai naudingomis savybėmis, tačiau stiprus jo hidrofobiškumas, jautrumas karščiui, drėgmei, deguoniui ir prastas tirpumas vandenyje smarkiai apriboja jo pritaikymą maisto, kosmetikos ir farmacijos pramonėje. Šių savybių gerinimui ir panaudojimo galimybių praplėtimui gali būti taikomi įvairūs β -karoteno įkapsuliavimo metodai.

1.2. β -Karoteno įkapsuliavimo metodai

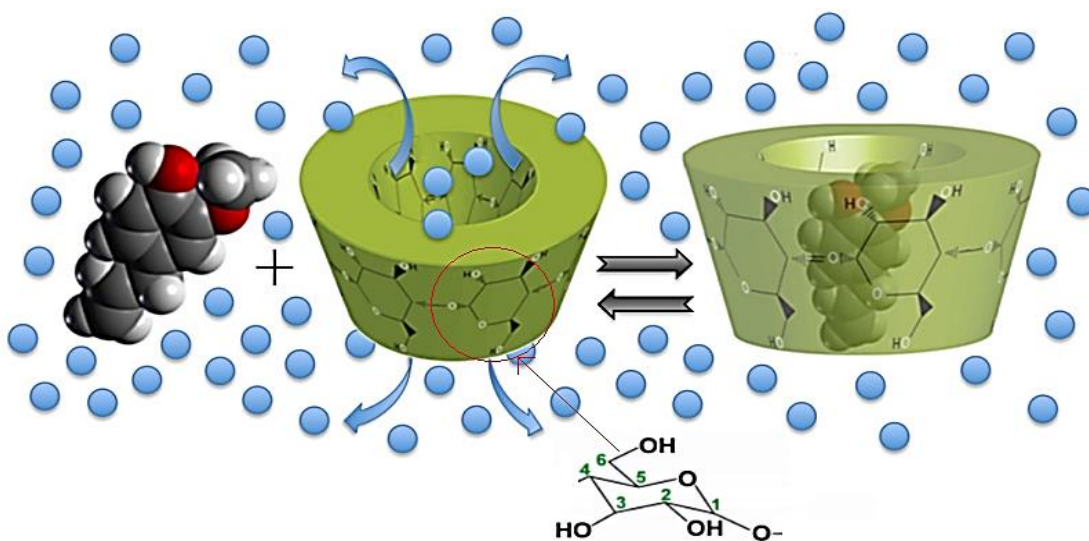
Įkapsuliavimas – tai technologija, kurios metu kieta, dujinė arba skysta medžiaga yra įterpiama į matricą arba padengiama polimeriniu apvalkalu. Pagrindinis įkapsuliavimo tikslas yra apsaugoti jautrias medžiagas nuo drėgmės, oksidacijos, temperatūros, šviesos arba kitų ekstremalių sąlygų gamybos ir saugojimo metu, kad būtų prailgintas produktų galiojimo laikas, arba būtų užslėpti nenorimi kvapai ar skoniai. Taip pat, parinkus tinkamą įkapsuliavimo metodą ir sąlygas, galima pasiekti kontroliuojamą aktyvių junginių atpalaidavimą. Paskutiniu metu įkapsuliavimas yra labai plačiai tiriamas, todėl auga jo pritaikymas pramonėje, agrokultūroje, medicinoje, farmacijoje ir biotechnologijoje. β K įkapsuliavimui naudojami įtarpos kompleksų, kietų lipidų nanodalelių, purškiamo džiovinimo bei emulsijų metodai. Taip pat gali būti taikomi ir kiti tradiciniai bei modifikuoti metodai, tokie kaip koacervacija, liposomos, geliacija,

emulsijos fazės atskyrimas, liofilizavimas, superkritiniai skysčiai ir kiti (Santos and Meireles, 2010).

1.2.1. Įtarpos kompleksų sintezė

Įtarpos kompleksų sintezė – tai procesas, kurio metu branduolio („svečio“) medžiaga įterpiama į nešančios („šeimininkės“) molekulės vidinę ertmę. Kaip molekulės „šeimininkės“ įtarpos kompleksų sintezei gali būti naudojami kaliksarenai, amilozė, dendrimerai ir ciklodekstrinai.

Amilozės ir β K įtarpos kompleksai pirmą kartą susintetinti prieš kelis metus. Prieš 2 metus atliktame tyrime įtarpos kompleksų sintezei panaudotas amilozės-askorbilo palmitato (AscP) mišinys. Gauti amilozės-AscP- β K įtarpos kompleksai buvo saugomi 20 ir 30 °C temperatūrose 6 savaites. Lyginant su kontrole (komponentų fiziniu mišiniu) β K išlaikymas saugant 20 °C ir 30°C temperatūrose buvo pagerintas atitinkamai 1,98 % ir 6,82 % (Kong, Bhosale and Ziegler, 2017). Taip pat kuriami galimi β K ir kaliksarenų (sulfonato-kaliks[n]areno, sulfoninto p-benzil- arba p-fenil-kaliks[5,6]areno) įtarpos kompleksų modeliai (Makha, McKinnon and Raston, 2002; Anantachoke et al., 2006). Vis dėlto, dažniausiai β K įtarpos kompleksų sintezei yra naudojami ciklodekstrinai (5 pav.).



5 pav. Ciklodekstrino įtarpos kompleksų formavimosi schema (Mura, 2014)

Ciklodekstrinai (CD) – tai cikliniai oligosacharidai, sudaryti iš $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidiniais ryšiais sujungtų D-gliukopiranozės vienetų (Mura, 2014; Singh, 2016). Plačiausiai kompleksų sintezei naudojami α -, β - ir γ -ciklodekstrinai, sudaryti atitinkamai iš 6, 7 ir 8 gliukopiranozės vienetų (Zaibunnisa, Aini-Marhanna and Ainun-Atirah, 2011). Egzistuoja net iki 19 gliukopiranozės vienetų turintys ciklodekstrinai, tačiau dėl mažų išeigų, sunkaus gryninimo, didelės kainos bei siauro vidinės ertmės diametro jų panaudojimas yra labai ribotas (Mura, 2014). Pagrindinių CD savybės pateiktos 2 lentelėje.

2 lentelė. α -, β - ir γ -ciklodekstrinų savybės (Mura, 2014)

Savybės	α -CD	β -CD	γ -CD
Gliukopiranozės vienetai	6	7	8
Molekulinis svoris, g/mol	972	1135	1297
Tirpumas vandenyje (25 °C), % w/v	14,5	1,85	23,2
Vidinės ertmės diametras, nm	0,47–0,53	0,60–0,65	0,75–0,83
Išorės diametras, nm	1,46	1,54	1,75
Ertmės aukštis, nm	0,79	0,79	0,79
Ertmės tūris, nm ³	0,174	0,262	0,472
H ₂ O skaičius ertmėje	6	11	17
Lydymosi temperatūra, °C	255–260	255–265	240–245

Dėl molekulėje esančių gliukopiranozės vienetų, kurie įgyja „kėdės“ konformaciją, CD būdinga nupjauto-kūgio forma. Plačiajame molekulės krašte yra išsidėsčiusios antrinės hidroksilo grupės (C2 ir C3), o siaurajame – pirminės hidroksilo grupės (C6). Dėl laisvų hidroksilo grupių molekulės išorė yra hidrofilinė. Glikozidiniai ryšiai tarp gliukopiranozės vienetų formuojasi per deguonies atomus (C1 ir C4), kurie molekulės vidinei ertmei suteikia hidrofobines savybes. Dėka vidinės ertmės hidrofobiškumo į ją gali būti įterpiamos hidrofobinės medžiagos, tokios kaip β K. Tarp „svečio“ ir „šeimininko“ molekulių susidaro nekovalentiniai ryšiai, tokie kaip van der Vals'o jėgos, hidrofobiniai ryšiai, elektrostatinės sąveikos ir/arba vandeniliniai ryšiai. Kompleksavimo mechanizmas yra paremtas vandens molekulių pakeitimu mažiau polinėmis medžiagomis (De Oliveira et al., 2011; Singh, 2016). Įtarpos kompleksų sintezė gali būti atliekama naudojant *ko*-nusodinimo, grūdimo, malimo, fizinio sumaišymo metodus bei ultragarsą (Zaibunnisa et al., 2011; Mele, Mendichi and Selva, 1998; Zhou, Jiang, Zhang and Li, 2012).

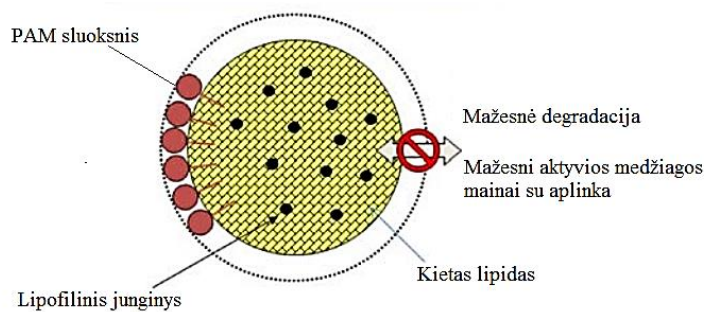
Dėl stiprių vidumolekulinių vandenilinių ryšių tarp antrinių hidroksilo grupių natūraliai egzistuojantys α -, β - ir γ -ciklodekstrinai pasižymi ribotu tirpumu vandenyje, nes šie ryšiai mažina galimybę formuoti vandenilinius ryšius su aplinkinėmis vandens molekulėmis. Norint gauti geresniu tirpumu vandenyje ir geresnėmis kompleksavimosi su hidrofobinėmis medžiagomis savybėmis pasižyminčius CD jie yra chemiškai modifikuojami (Lima Petito, Silvia Dias, Costa, Falcao and Lima Araujo, 2016; Karangwa et al., 2011; Mura, 2014).

β K įkapsuliuavus į CD ertmę pagerinamas jo tirpumas vandenyje, apsauga nuo šviesos, deguonies ir terminio poveikio, todėl pagerinamas jo stabilumas ir bioprieinamumas. Pavyzdžiui, β K įkapsuliuavus į α - ir β -ciklodekstrinus ir mėginius veikiant ultravioletine šviesa 20 °C temperatūros sąlygomis po 10 valandų veikimo, priklausomai nuo naudojamų medžiagų santykio, β -karotenas α - ir β -ciklodekstrinuose atitinkamai išlaikomas 80–90 % ir 90 %. Tuo tarpu kontrolėje po 10 valandų veikimo UV šviesa prarandamas visas β K. Po 30 valandų veikimo UV šviesa, priklausomai nuo santykio, β K α - ir β -ciklodekstrinuose atitinkamai išlaikomas 50–70 % ir 65–75 % (Rudometova, Kulishova and Kim, 2018).

1.2.2. Kietų lipidų nanodalelės

Kietų lipidų nanodalelės (KLN) – tai koloidinės pernašos sistema, apjungianti liposomų (membranos pralaidumo), polimerinių nanodalelių (kontroliuojamo atpalaidavimo) bei emulsijų (aukšto bioprieinamumo ir biosuderinamumo) privalumus, naudojama lipofilinių medžiagų, tokių kaip β K, įkapsuliuvimui, pernašai ir apsaugai nuo žalingų aplinkos veiksnių (Helgason et al., 2009; Hejri, Khosravi, Gharanjig and Hejazi, 2013).

KLN sudarytos iš kietų lipidų ir aktyvios medžiagos branduolio, apsupto stabilizuojančiu vienos PAM arba jų mišinio sluoksniu (6 pav.). Šių dalelių dydis gali svyruoti nuo 4 iki 1000 nm (Gutierrez et al., 2013; Weiss et al., 2008). Dažniausiai kaip lipidai naudojami įvairūs triacilgliceridai (pavyzdžiui, kakavos sviestas, hidrintas palmių aliejus), riebiosios rūgštys (pavyzdžiui, stearino rūgštis) bei vašakai ar jų mišiniai (Triplet II and Rathman, 2009; Qian, Decker, Xiao and McClements, 2013). Daugiausia šių nanodalelių chemines ir fizikines savybes nulemia sintezei pasirinkti lipidai ir PAM.



6 pav. KLN, kurioje įkapsuliuota lipofilinė bioaktyvi medžiaga, stabilizuota PAM sluoksniu (Weiss et al., 2008)

Kietų lipidų nanodalelių sintezė gali būti atliekama naudojant karštą arba šaltą aukšto slėgio homogenizavimą, ultragarsą, tirpiklio nugarinimą, mikroemulsifikacijos ir kitus metodus (Ekambaram, Sathali and Priyanka, 2012). Dažniausiai sintezei taikomas aukšto slėgio homogenizavimas, kur aktyvus ingredientas (β K) tirpinamas arba disperguojamas išlydytame kietame lipide. Naudojant šalto homogenizavimo metodą lydalas su aktyvia medžiaga

atvėsinaamas iki kambario temperatūros, susmulkinamas iki mikrodalelių, disperguotų šaltame PAM tirpale, ir homogenizuojamas – mikrodalelės dėl kavitacijos jėgų skyla iki nanodalelių. Naudojant karšto homogenizavimo metodą lydalas yra disperguojamas karštame PAM vandeniniame tirpale, homogenizuojamas aukštu slėgiu ir atvėsinaamas iki kambario temperatūros, žemesnės už nešančio lipido kristalizacijos temperatūrą, todėl formuojasi kietos dalelės (Gutierrez et al., 2013).

Norint išvengti trūkumų, susijusių su KLN įkapsuliuotos aktyvios medžiagos išleidimu į aplinką saugojimo metu, sintetinami nanostruktūrizuoti lipidų nešėjai (NLN). Šių dalelių sintezei naudojamas kietų ir skystų lipidų mišinys vandeniniame PAM tirpale – taip gaunama mažiau orientuota vidinė struktūra, todėl padidėja įkrovos galimybės ir sumažinama aktyvios medžiagos išleidimo į aplinką rizika (Hentschel, Gramdof, Muller and Kurz, 2008; Hejri et al., 2013).

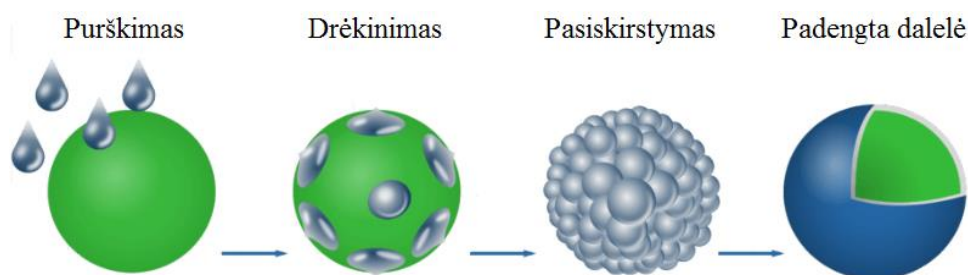
Įterpus β K į KLN pagerinamas bioprieinamumas, nes papildomas lipidų vartojimas pagerina jo absorbciją. Taip pat β K apsaugomas nuo oksidacinio poveikio, cheminės degradacijos, pagerinamas kontroliuojamas atpalaidavimas. Kiek pagerinamas stabilumas priklauso nuo to, ar aktyvi medžiaga sintezės metu įkapsuliuojama kietos matricos viduje, ar prisijungia prie lipido nanodalelės paviršiaus – tokiu atveju medžiaga nebus apsaugota nuo supančios aplinkos ir stabilumas nebus pagerintas (Helgason et al., 2009). Pavyzdžiui, β K KLN daleles sintetinant emulsifikavimo metodu, kur kaip lipidas naudojama stearino rūgštis, o kaip PAM – natrio taurocholatas, pasiekiamas 40 % β -karoteno įterpimo efektyvumas. Po mėnesio neužfiksuoti jokie β K koncentracijos pokyčiai, vadinasi nevyksta jokios degradacijos reakcijos ir β -karotenas išlieka stabilus (Triplet II and Rathman, 2009). Kitame tyrime β -karoteno įkapsuliavimui panaudotos stearilo ferulato KLN. Po 3 mėnesių mėginių saugojimo kambario temperatūroje atlikti dalelių dydžio bei įkapsuliavimo efektyvumo matavimai rodo, kad dalelių dydis kinta nuo 169,8 iki 188,4 nm, o įkapsuliavimo efektyvumas nuo 49,2 iki 48,4 % – pokyčiai minimalūs, vadinasi β -karotenas sėkmingai apsaugomas nuo oksidacijos bei degradacijos (Trombino et al., 2009).

1.2.3. Purškiamas džiovinimas

Purškiamas džiovinimas – tai aktyvios medžiagos įkapsuliavimo procesas, vykstantis skystos medžiagos džiovinimo į miltelius būdu. Tai viena seniausių ir populiariausių technikų, naudojamų karotinoidų įkapsuliavimui, pasižyminti maža kaina, plačiu branduolio ir dengiančios medžiagos pasirinkimu, geru įrangos prieinamumu, geru efektyvumu ir gauto produkto stabilumu (Correa-Filho, Lourenco, Moldao-Martis and Alves, 2019; Liang, Huang, Ma, Shoemaker and Zhong, 2013).

Dengianti medžiaga turi pasižymėti geromis emulsifikacijos savybėmis ir geromis plėvelę formuojančiomis savybėmis. Kaip dengianti medžiaga gali būti naudojami angliavandeniai (modifikuotas krakmolai, maltodekstrinas, pektinas, celiuliozė, gumiarabikas, agaras, karagenanas, ciklodekstrinas), baltymai (želatina, kazeinas, pieno arba sojos baltymai), lipidai (stearino rūgštis ir mono- arba digliceridai) ir jų mišiniai. Dažniausiai dengimui naudojami modifikuoti krakmolai, kurie be minėtų pageidaujamų savybių taip pat pasižymi maža klampa, didele įkrovos galia ir deguonies barjero savybėmis, arba krakmolo, maltodekstrino ir gumiarabiko kombinacija. Gautų dalelių savybės (dydis, pasiskirstymas, drėgmės kiekis, terminis stabilumas) priklauso nuo dengiančios medžiagos savybių ir džiovinimo sąlygų (srauto greičio, atomizavimo greičio, temperatūros, slėgio ir kitų) (Correa-Filho et al., 2019; Liang et al., 2013).

Pirmas įkapsuliavimo proceso etapas yra kietos matricos, į kurią bus įterpiama branduolio medžiaga, tirpalo paruošimas. Aktyvi medžiaga turi būti netirpi (kieta) arba nesimaišanti (skysta) su matricos tirpalu. Tada į matricos tirpalą pridedama branduolio medžiaga ir vykdomas energingas maišymas, kurio metu susidaro dispersija arba emulsija. Mišinys yra atomizuojamas į smulkius lašelius ir leidžiamas per karšto oro kamerą. Dėl sąveikos tarp lašelių ir karšto oro per kelias sekundes yra nugarinama apie 95 % lašeliuose esančio vandens ir dengianti medžiaga suformuoja kietą apvalkalą ant branduolio medžiagos (7 pav.) (Santos and Meireles, 2010; Re, 2007).



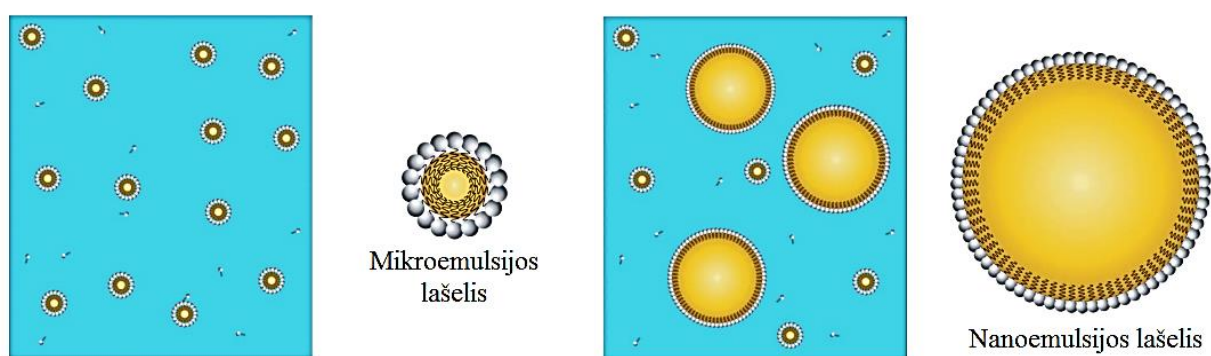
7 pav. Purškiamu dengimu gaunama kapsulė (Naz and Sulaiman, 2016)

β K dengimui purškiamo džiovinimo būdu naudojant modifikuoto krakmolo (MK), gumiarabiko (GA) ir maltodekstrino (MA) kombinaciją pagerinamas β -karoteno stabilumas saugojimo metu. Priklausomai nuo naudojamų dengiančių medžiagų santykio, β K išsaugojimas pagerinamas apie 23–42 %. Geriausi rezultatai gaunami dengimui naudojant MK, GA ir MA medžiagas santykiu 1:3:2. β K dengiant šių medžiagų mišiniu skilimo konstanta sumažėja apie 12,5 karto, o gyvavimo pusperiodis padidėja nuo 53 iki 288 dienų (Przybysz, Onacik-Gur, Majtczak and Dluzewska, 2016). Kitame tyrime β K turinčios *D. salina* biomasės dengimui panaudoti skirtingi MA / GA, GA / želatinos ir MA / želatinos santykiai (90:10 arba 50:50). Gautos dalelės saugotos šviesoje arba tamsoje skirtingose temperatūrose 7 savaites. Didžiausias

β K stabilumas (93,22 %) išlaikytas dengimui naudojant MA / GA medžiagas santykiu 90:10, mėginius saugant 4 °C temperatūroje tamsoje (Morowvat and Ghasemi, 2016).

1.2.4. Mikro- ir nanoemulsijos

Mikroemulsija – tai termodinamiškai stabili dispersinė sistema, sudaryta iš aliejaus ir vandens fazių, PAM ir dažniausiai jos veikimą gerinančios medžiagos (*ko*-PAM). Nanoemulsija – tai termodinamiškai nestabili, bet kinetiškai stabili dispersinė sistema, taip pat sudaryta iš aliejaus ir vandens fazių, PAM ir *ko*-PAM (8 pav.) (McClements, 2012). Šios emulsijos dėl savo mažo lašelių dydžio ir skaidrumo naudojamos β K įkapsuliavimui (bioprieinamumo, tirpumo gerinimui bei apsaugai nuo degradacijos) (Roohinejad et al., 2015; Silva et al., 2011).



8 pav. Mikroemulsijos ir nanoemulsijos lašeliai (McClements, 2012)

β -Karoteno įkapsuliavimui dažniausiai naudojamos aliejaus vandenyje tipo emulsijos. Didžiausią įtaką emulsijų formavimuisi turi emulsikliai, kurie sumažina tarpfazinę įtampą tarp aliejaus ir vandens fazių, taip sumažinant energijos kiekį, reikalingą mažų lašelių gavimui. Taip pat jie sukuria apsauginę plėvelę aplink lašelius ir juos apsaugo nuo koalescencijos (Silva et al., 2011). Dažniausiai šių emulsijų gamybai naudojamos PAM yra nejoninės medžiagos (Tween 40, Tween 80). Nors naudojant vieną PAM įmanoma pakankamai sumažinti tarpfazinę įtempimą, tačiau papildomai naudojant *ko*-PAM padidinama kritinė micelių susidarymo koncentracija ir dar labiau sumažinamas įtempimas. Kaip *ko*-PAM dažniausiai naudojami trumpo ar vidutinio grandinės ilgio alkoholiai (Santos, Watkinson, Hadgraft and Lane, 2008). Aliejinės fazės gavimui dažniausiai naudojami įvairūs lipidai – ilgų grandinių trigliceridai (sojų pupelių aliejus), vidutinio grandinės ilgio trigliceridai (frakcionuotas kokosų aliejus), riebiųjų rūgščių propileno glikolio esteriai (mono- ir digliceridai), riebiosios rūgštys (oleino rūgštis, palimitino rūgštis) ir lipidų mišiniai. Maisto pramonėje plačiausiai naudojami nesotieji ilgų grandinių trigliceridai. Vandeninei fazei dažniausiai naudojamas distiliuotas vanduo (Roohinejad et al., 2015).

Mikroemulsijų ir nanoemulsijų gamybai naudojamos tos pačios medžiagos ir gaunama panaši struktūra: nepolinės PAM uodegėlės nukreiptos į hidrofobinę aliejaus suformuotą šerdį, o polinės galvutės – į vandens fazę. Pagrindinis skirtumas tarp šių emulsijų yra jų termodinaminis

stabilumas. Nanoemulsijos pasižymi termodinaminiu nestabilumu, nes jos nepasiekia pusiausvyros būsenos, tačiau jų destabilizacijos kinetika yra labai lėta (mėnesiai) ir jos laikomos kinetiškai stabiliomis (Anton and Vandamme, 2010). Be to, mikroemulsijų gamybai yra naudojami mažos energijos metodai (spontaninė emulsifikacija, fazių inversija), o nanoemulsijų gamybai gali būti naudojami tiek didelės (tirpiklio pakeitimas, ultragarsas, emulsifikacijaugarinimas, aukšto slėgio homogenizacija, mikroskysčių technologijos), tiek mažos energijos metodai. Gaunamų mikroemulsijų dalelių dydis siekia 10–100 nm, tuo tarpu nanoemulsijų lašeliai yra didesni – dydis gali svyruoti nuo 20 iki 500 nm (Gupta, Eral, Hatton and Doyle, 2016; Jo and Kwon, 2014; Troncoso, Aquilera and McClements, 2011). Naudojant tas pačias medžiagas ir tuos pačius metodus galima gauti tiek mikro-, tiek nanoemulsijas, tačiau turi būti naudojami skirtingi medžiagų santykiai – mikroemulsijoms gauti naudojamas didesnis PAM perteklius (McClements, 2012).

Atlikti tyrimai rodo, kad β K nanoemulsijų gamybai galima panaudoti emulsifikavimo-nugarinimo ir homogenizavimo (naudojant mikroskysčių prietaisą) metodų kombinaciją. Gautų nanoemulsijų fizikinis stabilumas įvertintas stebint dalelių dydžio pasiskirstymo pokyčius – mėginiai buvo saugomi 4 °C temperatūroje 12 savaičių ir kas 4 savaites atlikti dydžio matavimai. Gauti rezultatai rodo, kad per 12 savaičių dalelių dydis nekito – tai reiškia, kad dalelės fiziškai yra stabilios, tačiau šios emulsijos pasižymėjo cheminiu nestabilumu, nes saugojimo metu per 12 savaičių β K koncentracija dalelėse sumažėjo apie 44,0–74,8 % (Tan and Nakajima, 2005). Kitame tyrime β -karoteno mikroemulsija paruošta spontaninio emulsifikavimo būdu, naudojant nejonines PAM (Span 80, Span 40 ir Tween 80, 10:5:85, w/w) ir kokosų arba palmių aliejų kaip aliejaus fazę, bei ištirtos emulsijoje esančių dalelių fizikocheminės savybės. Tyrimo rezultatai rodo, kad β K lėčiau ir mažiau degradavo emulsijoje, kurios gamybai panaudotas palmių aliejus – naudojant palmių aliejų per 4 savaites β K koncentracija emulsijoje sumažėjo tik apie 20 %, o naudojant gryną kokosų aliejų – net apie 90 %. Tai rodo, kad β -karoteno mikroemulsijų gamybai palmių aliejus yra tinkamesnis (Ariviani, Raharjo and Anggrahini, 2015).

1.2.5. Kiti įkapsuliavimo metodai

Be aptartų metodų β K įkapsuliavimui naudojami ir kiti metodai, kurių principai, pagrindiniai privalumai ir trūkumai, svarbūs tinkamo įkapsuliavimo metodo pasirinkimui, apibendrinti 3 lentelėje.

3 lentelė. Įkapsuliavimo metodai (Santos and Mereiles, 2010)

Įkapsuliavimo metodas	Principas	Privalumai	Trūkumai
Purškiamas aušinimas	Kaip aprašyto purškiamo džiovinimo, tik kameroje paduodamas šaltas oras.	Gali būti įkapsuliuojami temperatūrai jautrūs junginiai.	Sunku kontroliuoti dalelių dydį; vidutinė išeiga; reikalingos specialios sąlygos produkto saugojimui.
Paprastoji ekstruzija	Branduolio medžiagos dengimas vykdomas naudojant sriegtuvus. Srautas paduodamas į skysto džioviklio vonelę - kontakto metu apvalkalas sukietėja.	Pilnas padengimas; atliekama ganėtinai žemose temperatūrose.	Kapsulė turi būti atskirta nuo skysčio ir džiovinama; sunku gauti kapsules, kai nešiklis yra labai klampus.
Centrifuginė ekstruzija	Panašus į paprastosios ekstruzijos, bet branduolio ir dengiančioji medžiagos sudaro vientisą srautą tik pačiam gale ištekant pro antgalį su koaksialine anga dėl centrifuginės jėgos.	Tokie pat kaip paprastosios ekstruzijos.	Tokie pat kaip paprastosios ekstruzijos.
Joninė geliacija	Dengiančioji medžiaga su ištirpinta branduolio medžiaga yra lašinamos į joninį tirpalą. Kapsulės suformuojamos dėl joninės sąveikos.	Organinių tirpiklių ir ekstremalių temperatūrų išvengimas.	Naudojama mažos apimties gamybai; gautos kapsulės pasižymi dideliu poringumu, todėl gali staigiai plyšti.
Terminė geliacija	Principas panašus į joninės geliacijos, tačiau nebūtinai joninis tirpalas, nes geliacija vyksta dėl terminių sąlygų.	Tokie pat kaip joninės geliacijos.	Tokie pat kaip joninės geliacijos.
Pseudoverdančio sluoksnio dengimas	Paremtas dengiančiosios medžiagos purškimu į pseudoverdantį branduolio medžiagos sluoksnį.	Žema proceso kaina; leidžia gauti specifinį kapsulių dalelių pasiskirstymą ir mažą poringumą.	Temperatūrai jautrių junginių degradacija.

3 lentelės tęsinys

Liofilizavimas	Įterpimas gaunamas liofilizuojant emulsinį tirpalą, kurį sudaro branduolio ir dengiančioji medžiagos.	Naudojant šį metodą galima efektyviai įkapsuliuoti temperatūrai jautrias medžiagas, nestabilias vandeninėje terpėje.	Ilgas proceso laikas ir didelė kaina; brangus kapsulių saugojimas ir transportavimas.
Emulsinė polimerizacija	Branduolio medžiaga tirpinama vandeniniame monomerų tirpale, kurie polimerizuojami ir suformuojamos kapsulės.	Gaunamos mikro- arba nanokapsulės, pasižyminčios siauru dydžio pasiskirstymu.	Sunku kontroliuoti kapsulės formavimąsi (polimerizaciją).
Koacervacija	Įkapsuliavimas pagrįstas skystos dengiančiosios medžiagos nusodinimu ant branduolio medžiagos dėl elektrostatinių jėgų.	Gali būti naudojama įkapsuliuoti temperatūrai jautrias medžiagas.	Naudojamos toksiškos cheminės medžiagos; ant kapsulių paviršiaus lieka tirpiklių ir koacervacijos agentų likučių; sudėtingas ir brangus metodas.
Emulsijos fazės atskyrimas	Branduolio medžiaga pridedama į polinį arba nepolinį aliejaus vandenyje arba vandens aliejuje emulsijos sluoksnį. Emulsijos paruošiamos naudojant PAM.	Gali būti įterpti poliniai, nepoliniai ir amfifiliniai junginiai; emulsijos gali būti naudojamos tiesiogiai savo skystoje būsenoje.	Kapsulės jautrios aplinkos veiksniams, tokiems kaip karštis, džiovinimas ir kiti; ribotas emulsiklių tinkamumas.
Liposomos	Fosfolipidai tirpinami vandeninėje fazėje dėl spontaninės saviorganizacijos susidaro liposomos. Branduolinė medžiaga yra „įkalinama“ liposomos viduje.	Galima įkapsuliuoti tiek vandenyje, tiek lipiduose tirpias medžiagas; efektyviai kontroliuojama pernaša.	Dažniausiai naudojama laboratorinėje skalėje.

Norint sumažinti esamų metodų trūkumus jie yra tobulinami ir kuriamos įvairios alternatyvios technologijos. Viena naujesnių technologijų, naudojamų įkapsuliavimui, yra superkritiniais skysčiais paremti metodai, kuriuose organiniai tirpikliai keičiami į draugiškus aplinkai, įkapsuliavimas vykdomas švelnesnėmis sąlygomis ir gaunamos homogeniškos mikro- arba nanokapsulės. Šie metodai gali apsaugoti karotinoidus nuo greitos degradacijos (Santos and Meireles, 2010).

Norint pasiekti geresnį įkapsuliavimo efektyvumą, aktyvaus ingrediento stabilumą, tirpumą ir pagerinti kitas savybes, dalelės taip pat gali būti sintetamos naudojant įvairias išvardintų metodų kombinacijas arba atliekant daugiasluoksnių arba daugiafunkčių nanodalelių sintezę.

2. METODINĖ DALIS

2.1. Medžiagos ir prietaisai

2.1.1. Medžiagos

Pavadinimas	Gamintojas
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH laisvasis radikalas), 95 %	Alfa Aesar
2-Hidroksipropil- β -ciklodekstrinas „Cavasol™ W7 HP PHARMA“	Ashland Industries Europe GmbH
Acetonas	UAB „Eurochemicals“
Acetonitrilas	Roth
Amonio acetatas	Reachim
Aukšto esterifikacijos laipsnio pektinas, galakturoninės rūgšties kiekis ≤ 34 %	Fluka Chemie AG
Cikloheksanas	UAB „Eurochemicals“
Dichlormetanas	Roth
Dimetilsufoksidas	Honeywell Riedel-de Haën™
Druskos rūgštis	Merck
Etanolis 96,3 %	Vilniaus degtinė
Metanolis	Roth
Natrio šarmas	Reachim
n-Heksanas	UAB „Eurochemicals“
Pektino rūgštis	Serva
Tetrahidrofuranas	Roth
Žemo esterifikacijos laipsnio pektinas, galakturoninės rūgšties kiekis ≥ 74 %	Sigma-Aldrich®
β -Karotenas, ≥ 97 %	Sigma-Aldrich®

2.1.2. Prietaisai

Pavadinimas	Gamintojas
Analitinės svarstyklės „ABJ-NM / ABS-N“ (Max 220 g, d=0,1 mg)	KERN
Atvirkščių fazių C ₁₈ HPLC kolonėlė (250 mm x 4,6 mm)	Biorad

Automatinės pipetės	Eppendorf
Centrifuga „Eppendorf“	Eppendorf
Centrifuga „Rotina 35R“	Hettich
Dvigubo bangos ilgio absorbcijos detektorius	Waters
Dvilypė HPLC pompa	Waters
Frontier FT-IR spektrofotometras	PERKIN-ELMER
Kaitinanti magnetinė maišyklė „MSH 300“	BIOSAN
Koncentratorius	Eppendorf
Liofilizatorius „Alpha 2–4 LSC“	Martin Christ
Magnetinė maišyklė „MS 3000“	BIOSAN
Magnetinė maišyklė „REO Basic C“	IKA®
Peristaltinis siurblys „2115“	LKB Bromma
pH-metras	METTLER TOLEDO
RamanStation 400F spektrofotometras	PERKIN-ELMER
Rankinis spektrofotometras „CM-700d“	Konica Minolta
Rotacinis vakuuminis garintuvas „RV 10 basic“	IKA®
Aukšto galingumo plokštelių spektrofotometras „Eon™“	Biotek
Spektrofotometras „Ultrospec 4000“	Pharmacia Biotech
Sterilūs 0,45 µm porų PES filtrai	Roth
Svarstyklės „SPO 61“ (Max 3100 g, d=0,1 g)	SCALTEC
Šaldiklis	Snaigė
Šaldytuvas	Snaigė
Termomikseris „Eppendorf Thermo Mixer C“	Eppendorf
Termomikseris „Eppendorf Thermo Mixer Comfort“	Eppendorf
Termostatuojama purtyklė „IST-3075R“	Jeio Tech
Ultragarsinė vonelė	Unitra
Ultragarsinis dezintegratorius „Vibracell“	SONICS, VCX 750
UV lempa (30 W)	Philips
Vakuuminio filtravimo sistema	Sartorius
Vienkartiniai švirkštai	Eurovaistinė
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical

2.1.3. Kompiuterinės programos

Nr.	Pavadinimas
1.	Microsoft Office programinė įranga
2.	SWIFT II Wavescan programinė įranga
3.	Gen5 2.01 programinė įranga
4.	Breeze programinė įranga
5.	Malvern Zetasizer 7.03 programinė įranga

2.2. Metodai

2.2.1. β -Karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksų sintezė

Vandenyje tirpūs kompleksai ruošiami *ko-nusodinimo* metodu. Pirmiausia paruošiamas 25 % 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino tirpalas – 1,75 g HCD miltelių tirpinama 7 mL distiliuoto vandens, tirpalą maišant ant magnetinės maišyklės. Atskirai paruošiamas 0,33 mg/mL koncentracijos β K acetoninis tirpalas – atsveriamas 10 mg β K miltelių ir tirpinama 30 mL acetono. Tirpalas 45 minutes maišomas ant magnetinės maišyklės, po to filtruojamas naudojant vakuuminę filtravimo sistemą su stikliniu filtru (porų dydis yra 100 μ m). Paruoštas β K acetoninis tirpalas automatine pipete lėtai lašinamas į maišomą ir kaitinamą (65 °C temperatūra) vandeninį HCD tirpalą. Tirpalų sąlyčio metu acetonas nugaruoja, o β K pereina į vandeninį tirpalą ir formuojasi įtarpos kompleksai. Visiškai nugaravus acetoniui, nesureagavęs ir vandenyje neištirpęs β K nufiltruojamas naudojant vienkartinį švirkštą bei sterilų polieterio sulfono (PES) filtrą (porų dydis yra 0,45 μ m). Gautas vandeninis įtarpos kompleksų tirpalas (7 mL) naudojamas tolimesniems eksperimentams.

Analogiškai atliekama sintezė ir kitomis sąlygomis: β K tirpinant kitame organiniame tirpiklyje (dichlormetane, etanolyje, heksane) arba naudojant kitos koncentracijos vandeninį ciklodekstrino tirpalą (0,5; 5; 50 %), arba kaitinimo temperatūrą (80 °C).

2.2.2. Įtarpos kompleksų papildomas dengimas pektinu

Tyrimė naudojami trys skirtingo esterifikacijos laipsnio pektinai – pektino rūgštis, žemo esterifikacijos laipsnio pektinas (galakturoninės rūgšties kiekis ≥ 74 %) ir aukšto esterifikacijos laipsnio pektinas (galakturoninės rūgšties kiekis ≤ 34 %). Pirmiausia paruošiami pradiniai 2 mg/mL koncentracijos pektinų vandeniniai tirpalai – atsveriamas 100 mg pektino ir tirpinama 50 mL vandens maišant magnetine maišykle 24 valandas kambario temperatūroje. Pradiniai pektinų tirpalai skiedžiami ir paruošiami 0,5 mg/mL koncentracijos tirpalai. Pektinų tirpalų pH koregavimui iki 4, 5, 6 arba 7 naudojamas 0,1 M koncentracijos NaOH arba HCl

vandeninis tirpalas. Gauti tirpalai filtruojami švirkštu su steriliu PES filtru ir naudojami papildomam β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino įtarpos kompleksų dengimui.

Įtarpos kompleksų dengimas atliekamas į 2,4 mL ant magnetinės maišyklės maišomo pektino (rūgšties, žemo arba aukšto esterifikacijos laipsnio) vandeninį tirpalą 0,25 mL/min greičiu peristaltiniu siurbliu lašinant 0,2; 0,4 arba 0,6 mL kompleksų vandeninio tirpalo. Galutinis susintetintų trikomponentinių dalelių vandeninių tirpalų tūris turi būti 3 mL, todėl lašinant 0,2 ir 0,4 mL kompleksų tirpalo prieš tai į pektino tirpalą papildomai įpilama atitinkamai 0,4 arba 0,2 mL distiliuoto vandens. Paruošti mėginiai purtomi purtyklėje per naktį tamsoje 100 rpm greičiu, 20 °C temperatūros sąlygomis.

2.2.3. β -Karoteno koncentracijos nustatymas

Norint nustatyti β K koncentraciją susintetintuose įtarpos kompleksuose bei trikomponentėse dalelėse jie turi būti suardyti. Tam 1 mL vandeninio tiriamojo tirpalo sumaišoma su 2 mL etanolio ir 3 mL heksano. Gautas mišinys veikiamas ultragarsu 5 minutes (prietaiso režimas: 15 s įjungta, 15 s išjungta, 80 % amplitudė). Ekstrakcija kartojama tris kartus ir gautos heksano fazės su ištirpusiu β -karotenu apjungiamos. β -Karoteno koncentracija heksano tirpale nustatoma naudojant ultravioletinės-regimosios šviesos (UV-Vis) spektroskopijos arba atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografijos (RP-HPLC) metodą.

Kompleksų ardymui taip pat išbandyti kiti metodai, plačiau aprašyti 3.1.1. skyriuje.

2.2.3.1. Ultravioletinės-regimosios šviesos spektroskopija

β K koncentracija (mg/mL) nustatoma matuojant po ekstrakcijos gautos heksano fazės su β -karotenu sugertį 450 nm bangos ilgyje ir taikant Beer'o-Lambert'o dėsnį:

$$C = \frac{Abs_{max} \cdot PF}{A^{1\%}_{1cm}} \times 10 \quad (1)$$

Čia A_{max} yra β K sugerties maksimumas 450 nm bangos ilgyje, l – kiuvetės plotis (cm), $A^{1\%}$ – β K masės ekstinkcijos koeficientas heksane ($2590 \text{ g}^{-1} 100 \text{ mL cm}^{-1}$), PF – praskiedimo faktorius.

Visi matavimai yra kartojami bent po tris kartus, apskaičiuojamas vidurkis ir standartinis nuokrypis.

2.2.3.2. Atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografija

Norint pasirinkti tinkamą mobilią fazę pradžioje naudoti du skirtingi tirpalų mišiniai: acetonitrilo, dichlormetano, metanolio (70:20:10) mišinys arba acetonitrilo, metanolio, tetrahidrofurano ir vandeninio amonio acetato (20 mmol/L) tirpalų mišinys (68:22:7:1). Prieš naudojimą mobilios fazės nuorinamos jas 10 minučių veikiant ultragarsu ir 0,4 bar slėgiu.

Prieš leidžiant mobilią fazę per RP-HPLC sistemą A ir B pompos nuorinamos rankiniu būdu (švirkštu), o tada naudojant Breeze programą (5 min, siurbimo greitį palaipsniui keliant nuo 1 iki 5 mL/min). Tirpalas A: distiliuotas vanduo, tirpalas B: mobili fazė. Naudojama C₁₈ kolonėlė (0,46x25 cm). Sistema lygsvarinama 40 minučių mobilią fazę 1 mL/min greičiu.

Tiriamąjį tirpalą analizė atliekama keliais etapais. Po ekstrakcijos gauto tirpalo tirpiklis nugarinamas naudojant rotacinį vakuuminį garintuvą (85 rpm, 50 °C), gautos nuosėdos sveriamos ir ištirpinamos mobilią fazę (be amonio acetato). Tada į sistemą švirkštu įvedama 20 µL tiriamojo tirpalo ir naudojamas izokratinis mobilios fazės režimas (1 mL/min greičiu). Prieš leidžiant naują mėginį atliekamas kolonos praplovimas. Gauta chromatograma integruojama taikant Breeze programą. βK koncentracija tiriamuosiuose tirpaluose apskaičiuojama naudojant prieš tai paruoštos kalibracinės kreivės lygtį:

$$y = 352704 \cdot x \quad (2)$$

Čia y yra smailės plotas, o x – β-karoteno koncentracija µg/mL.

2.2.4. Stabilumo tyrimai

2.2.4.1. Dinaminės šviesos sklaidos ir zeta potencialo matavimai

Susintetintų trikomponenčių dalelių dydžių ir zeta potencialų matavimai atliekami naudojant *Zetasizer Nano ZS* analizatorių su 4 mV HeNe lazeriu (633 nm). Išsklaidytos šviesos intensyvumo matavimai atliekami 20 °C temperatūroje, 173° kampu. Dalelių dydžio pasiskirstymas gaunamas iš koreliacijos funkcijų. Gauti duomenys konvertuojami naudojant *Malvern Zetasizer 7.03* programinę įrangą. Tirpale esančių dalelių dydis yra nustatomas taikant Stoks'o-Enštein'o lygtį:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (3)$$

Čia D – difuzijos koeficientas, k – Bolcmano konstanta, T – temperatūra (°C), η - tirpiklio klampa, o R_h – dalelių, esančių tirpale, hidrodinaminis spindulys.

Elektroforetinis mobilumas matuojamas 20 °C temperatūroje, taikant 80 mV įtampą, naudojant vienkartinės kapiliarines kiuvetes. Tai yra santykis tarp nanodalelių judėjimo greičio ir išorinio lauko, kuris konvertuojamas į zeta potencialą, taikant Henr'io lygtį:

$$\mu_e = \frac{2\epsilon z f(k\alpha)}{3\eta} \quad (4)$$

Čia μ_e - elektroforetinis judrumas, z – zeta potencialas, ε – dielektrinė konstanta, η - absoliutaus nulinio poslinkio tirpalo klampa, f(k·α) – Henr'io funkcija, kur α – dalelės spindulys, k – Debye parametras.

Prieš kiekvieno mėginio matavimą atliekamas 60 sekundžių prietaiso kalibravimas. Visi matavimai yra kartojami bent po tris kartus, apskaičiuojamas vidurkis ir standartinis nuokrypis.

2.2.4.2. Poveikis ultravioletine šviesa

Norint nustatyti β K, esančio susintetintuose įtarpos kompleksuose arba trikomponentėse dalelėse, atsparumą UV šviesai į 96 šulinėlių plokštelę automatine pipete pilama 250 μ L β K-HCD įtarpos kompleksų arba β K-HCD-pektino (trikomponenčių dalelių) vandeninių tirpalų. Plokštelėje esantys tiriamieji tirpalai veikiami UV šviesa, kaip šviesos šaltinį naudojant 30 W UV-C lempą. Mėginių atstumas nuo šviesos šaltinio yra 15 cm. Tam tikrais laiko intervalais (15, 30, 60, 120 ir 180 minučių poveikio UV šviesa) matuojama tiriamųjų tirpalų sugertis 450 nm bangos ilgyje. Trikomponentėse dalelėse arba įtarpos kompleksuose esančio β K santykinis stabilumas (%) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Santykinis stabilumas (\%)} = \frac{A_0}{A_t} \cdot 100 \% \quad (5)$$

Čia A_0 – mėginio sugertis nuliniu laiko momentu, o A_t – mėginio sugertis atitinkamo laiko momentu.

Visi matavimai yra kartojami bent po tris kartus, apskaičiuojamas vidurkis ir standartinis nuokrypis.

2.2.4.3. Terminis stabilumas

Norint įvertinti terminį β K, esančio susintetintuose įtarpos kompleksuose arba trikomponentėse dalelėse, stabilumą į 5 mL talpos mėgintuvėlius automatine pipete pilama po 2 mL β K-HCD įtarpos kompleksų arba β K-HCD-pektino vandeninių tirpalų. Mėgintuvėliai su tiriamaisiais tirpalais dedami į termomikserį ir kaitinami 60 arba 95 °C temperatūroje. Tam tikrais laiko intervalais (15, 30, 60, 120 ir 180 minučių terminio poveikio) matuojama tiriamųjų tirpalų sugertis 450 nm bangos ilgyje. Trikomponentėse dalelėse arba įtarpos kompleksuose esančio β K santykinis stabilumas (%) apskaičiuojamas pagal 5 formulę.

Visi matavimai yra kartojami bent po tris kartus, apskaičiuojamas vidurkis ir standartinis nuokrypis.

2.2.5. Spalvos matavimas

Mėginių spalva matuojama naudojant rankinį spektrofotometrą (kolorimetą), kuris prieš matavimus kalibruojamas naudojant baltos spalvos standartą. Prietaisas gautus rezultatus pateikia CIE Lab spalvų sistemos koordinatėse L^* , a^* ir b^* , kur L^* – šviesumo / tamsumo

rodiklis (svyruoja nuo 0 (juodos) iki 100 (baltos)), b^* – žalumo / raudonumo rodiklis (svyruoja nuo -80 iki +100), o a^* – mėlynumo / geltonumo rodiklis (svyruoja nuo -50 iki +70).

β K-HCD įtarpos kompleksų ir kompleksų, padengtų pektinų tirpalais, kurių pH yra 4, vandeniniai tirpalai (2 mL) džiovinami koncentratoriuje 30 °C temperatūroje apie 6 valandas. Gauti milteliai sveriami ir tolygiai paskirstomi ant 4 cm skersmens apvalių stiklinių plokštelių. Matuojama šviežiai paruoštų mėginių bei mėginių, saugomų tamsoje 4 °C temperatūroje, spalva po tam tikro laiko (4 ir 6 savaičių). Visi matavimai yra kartojami bent po tris kartus, apskaičiuojamas vidurkis ir standartinis nuokrypis.

Bendras spalvų skirtumas (ΔE^*) apskaičiuojamas naudojant Hunter'io-Skotfield'o lygtį:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (12)$$

Spalvos prisotinimas (C^*) apskaičiuojamas naudojant a^* ir b^* koordinates:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (13)$$

Spalvos prisotinimas apibūdina produkto blankumą / ryškumą ir jo reikšmės gali svyruoti nuo 0 iki 60.

2.2.6. Antioksidacinis aktyvumas

Antioksidaciniam aktyvumui nustatyti naudojamas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) laisvojo radikalo metodas. Pirmiausia paruošiamas 0,1 mM DPPH-etanolio tirpalas, kuris maišomas su mėginiais santykiu 1:1 (v/v) ir mišinys inkubuojamas tamsoje 300 minučių. Palyginamieji tirpalai ruošiami taip pat tik vietoj DPPH-etanolio tirpalo su tiriamaisiais mėginiais maišomas etanolis arba vietoj tiriamųjų mėginių su DPPH-etanolio tirpalu mažomas vanduo. Į 96 šulinėlių plokštelę automatine pipete supilama po 250 μ L mėginių ir matuojama sugertis 517 nm bangos ilgyje. Antioksidacinis aktyvumas (RSA) skaičiuojamas naudojant lygtį:

$$RSA = \left(\frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \right) \cdot 100 \% \quad (14)$$

Čia A_0 – DPPH etanolio tirpalo ir mėginio tirpiklio (vandens) mišinio sugertis, A_i – DPPH etanolio tirpalo ir mėginio tirpalo mišinio sugertis, A_j – mėginio tirpalo ir etanolio mišinio sugertis 517 nm bangos ilgyje.

Visi matavimai yra kartojami bent po tris kartus, apskaičiuojamas vidurkis ir standartinis nuokrypis.

2.2.7. Spektroskopinė analizė

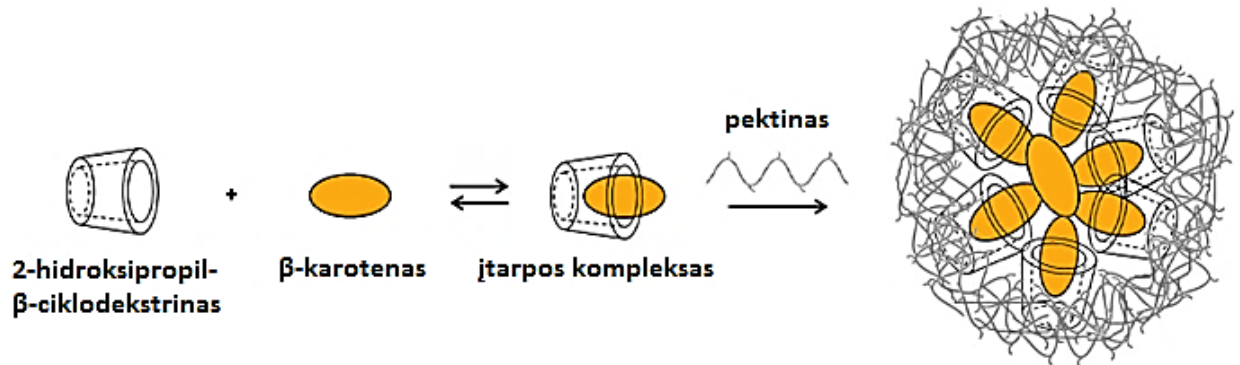
Liofilizuotų mėginių ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, 74 valandas) FT-IR spektrai buvo užrašyti PERKIN-ELMER Frontier spektrometru, naudojant universalų atspindžio (UATR) priedą. Skenavimo diapazonas $500\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, 500 skenų, 4 cm^{-1} skiriamoji geba.

Liofilizuotų mėginių Ramano spektrai užrašyti naudojant PERKIN-ELMER RamanStation 400F spektrometrą. Sužadinimo šaltinis – 100 mW artimosios infraraudonosios spinduliutės ($\lambda = 875\text{ nm}$) lazeris. Dažnių intervalas $300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, rezoliucija – 2 cm^{-1} .

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Įtarpos kompleksų sintezės sąlygų optimizavimas

Trikomponentės dalelės gaunamos β C-HCD įtarpos kompleksus dengiant pektinu (9 pav.), todėl pirmiausia optimizuojamos β -karoteno (β K) ir 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino (HCD) įtarpos kompleksų (β K-HCD) sintezės sąlygos (β -karoteno tirpiklio, sintezės temperatūros bei ciklodekstrino koncentracijos vandeniniame tirpale parinkimas).



9 pav. Galima trikomponenčių dalelių sintezės schema

Šis etapas reikalingas tam, kad β -karotenas būtų kuo efektyviau įkapsuliuojamas į 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino molekulės vidinę ertmę.

3.1.1. β -Karoteno koncentracijos nustatymas įtarpos kompleksuose

Įtarpos kompleksų sintezės sąlygos optimizuojamos remiantis įkapsuliavimo efektyvumu, t. y. β K koncentracija įtarpos kompleksuose. Tam, kad būtų galima nustatyti β K koncentraciją įtarpos kompleksuose, pirmiausia kompleksai turi būti suardomi, kad β K pereitų į organinę fazę, o tada atliekama RP-HPLC analizė. Atlikus literatūros apžvalgą iš viso išbandyti 8 ekstrakcijos būdai (4 lentelė). Ardymui naudoti įtarpos kompleksai, gauti į 5 % HCD vandeninį tirpalą lašinant acetoninį β K tirpalą ir sintezę atliekant 65 °C temperatūroje.

4 lentelė. βK ekstrakcijos būdai

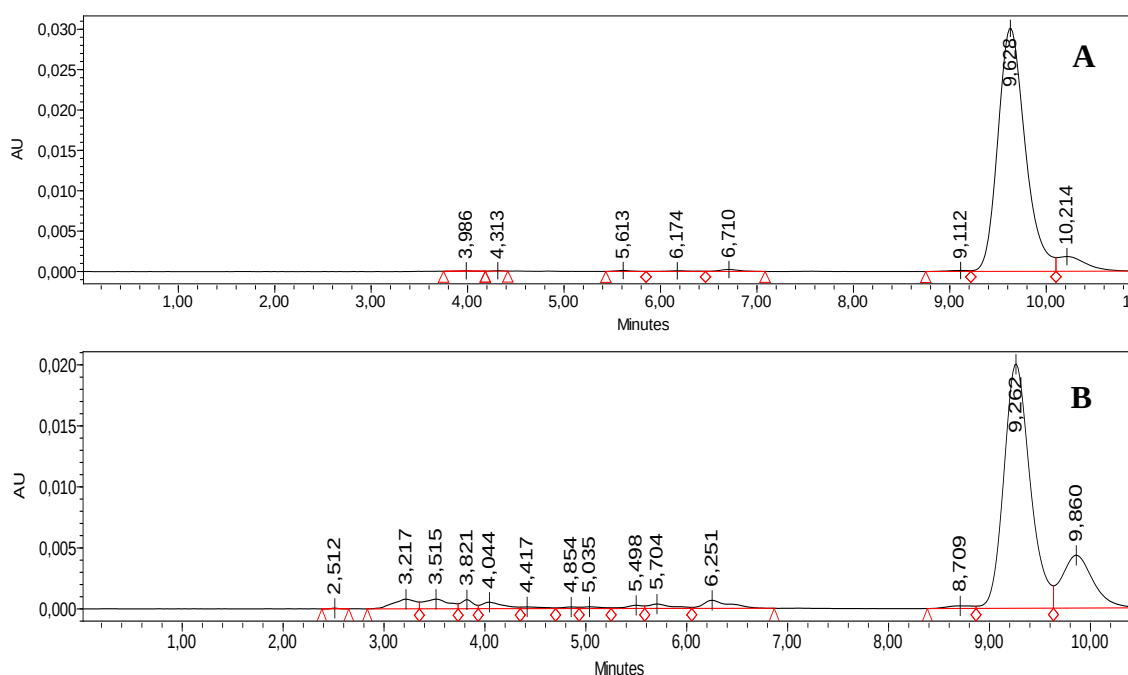
Nr.	Principas	Šaltinis
1	Komplekso vandeninis tirpalas maišomas su etanolio ir heksano santykiu 1:2:3, tada mišinys purtomas purtyklėje (15 min, 30 °C, 650 rpm), arba veikiamas ultragarsu (10 min) ir purtomas purtyklėje (60 min, 30 °C, 650 rpm arba 120 min, 30 °C, 650 rpm).	(Kaur et al., 2016)
2	Komplekso vandeninis tirpalas maišomas su etanolio ir heksano santykiu 1:2:3, tada veikiamas ultragarsu (2 min). Ekstrakcija kartojama 3 kartus ir fazės apjungiamos.	(Kaur et al., 2016)
3	Komplekso vandeninis tirpalas šildomas (15 min, 70 °C), tada maišomas su cikloheksanu santykiu 1:1, maišomas ir purtomas (3 min), o tada veikiamas ultragarsu (2 min). Ekstrakcija kartojama 3 kartus ir fazės apjungiamos.	(Kim, Seo and Lim, 2013)
4	Komplekso vandeninis tirpalas šildomas (15 min, 70 °C), tada maišomas su cikloheksanu santykiu 1:1 ir maišomas bei purtomas (3 min).	(Kim et al., 2013)
5	Komplekso vandeninis tirpalas maišomas su dichlormetanu santykiu 1:2, tada mišinys maišomas ir purtomas (1 min) ir centrifuguojamas (10 min, 1500 rpm).	(Lockwood, O'malley and Mosher, 2003)
6	Komplekso vandeninis tirpalas maišomas su acetono ir heksano santykiu 1:2:2.	(Basu and Vecchio, 2001)
7	Komplekso vandeninis tirpalas maišomas su dimetilsulfoksidu santykiu 1:9, mišinys maišomas ir purtomas (3 min), pridedamas heksano ir dichlormetano (1:4) mišinys, purtoma purtyklėje (10 min, 25 °C, 650 rpm) ir centrifuguojama (10 min, 3000 rcf).	(Liang et al., 2013)
8	Kompleksas tirpinamas acetonitrilo ir etanolio mišinyje (1:5), tada veikiamas ultragarsu (10 min), centrifuguojama (5 min, 18 °C, 9000 rpm) ir nusiurbiamas nereikalingas supernatantas.	(De Limo, Silva Dias, Costa, Falcao and de Lima Araujo, 2016)

Didžiausia βK koncentracija (t.y. didžiausias įkapsuliavimo efektyvumas) nustatyta įtarpos kompleksuose, kurie suardyti naudojant būdą nr. 2 (4 lentelė), todėl βK koncentracijos nustatymui toliau naudojamas šis βK-HCD suardymo būdas.

Atlikus literatūros apžvalgą pradžioje buvo pasirinktos dvi RP-HPLC sistemos mobilios fazės – acetonitrilo, dichlormetano ir metanolio (70:20:10) mišinys (Stutz, Bresgen and

Eckl, 2015) arba acetonitrilo, metanolio, tetrahidrofurano ir vandeninio amonio acetato tirpalo (20 mmol/L) (68:22:7:1) mišinys (Varzakas and Kiokias, 2016). Atlikus gryno bei iš kompleksų išekstrahuoto β K RP-HPLC analizę naudojant abi mobilias fazes ir atsižvelgus į gautų chromatogramų tikslumą, reikalingą plovimų skaičių, laiką bei kalibracinių kreivių tikslumą, tolimesniems tyrimams pasirinkta naudoti antrą mobilią fazę.

Atlikus gryno ir išekstrahuoto iš įtarpos kompleksų β K RP-HPLC analizę, naudojant antrą mobilią fazę, gautos chromatogramos, kuriose matoma, kad mėginiuose esančio β K sulaikymo laikas bei bendras vaizdas sutampa (10 pav.).



10 pav. A – gryno β K, B – β K, išekstrahuoto iš įtarpos kompleksų, susintetintų naudojant 5 % HCD tirpalą ir acetoninį β K tirpalą, chromatogramos

Šie rezultatai rodo, kad pavyksta β K įterpti į 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino molekulę, efektyviai suardyti gautus kompleksus ir nustatyti β K koncentraciją. Išekstrahuoto iš įtarpos kompleksų β K chromatogramoje išryškėja antra smailė – remiantis literatūra, galima teigti, kad padaugėja 9-*cis*- β -karoteno izomero (Gomes, Petito, Costa, Falcao and de Limo Araujo, 2014; Stutz et al., 2015). Šio izomero gali daugėti tiek dėl mėginio sąlyčio su oru (oksidacijos), tiek dėl pačio kapsuliavimo ar ekstrakcijos proceso.

3.1.2. β -Karoteno tirpiklio ir sintezės temperatūros parinkimas įtarpos kompleksų sintezei

Nustačius optimalias β K koncentracijos nustatymo sąlygas buvo renkamas tinkamiausias β K tirpiklis ir kompleksų sintezės temperatūra. β K-HCD įtarpos kompleksai sintetinami *ko*-nusodinimo metodu, β K tirpalą lašinant į kaitinamą HCD vandeninį tirpalą, todėl

tam, kad vyktų efektyvus β K įterpimas į HCD molekulės ertmę, svarbu pasirinkti tinkamą tirpiklį β K tirpinti. Tirpinant β K išbandyti keturi skirtingi tirpikliai – acetonas, dichlormetanas, heksanas ir etanolis. Įtarpos kompleksų sintezei naudotas 5 % HCD vandeninis tirpalas, o procesas atliktas temperatūrose, aukštesnėse nei atitinkamo tirpiklio virimo temperatūra. Įtarpos kompleksai, gauti naudojant skirtingus β K tirpiklius, suardyti ir nustatyta β K koncentracija vandeniniuose kompleksų tirpaluose (5 lentelė).

5 lentelė. β K koncentracija β K-HCD, sintezei naudojant skirtingus β K tirpiklius. Įtarpos kompleksų sintezei naudotas 5 % HCD tirpalas

Nr.	Tirpiklis	β -Karoteno tirpumas tirpiklyje, mg/mL (Craft, 1992)	β K koncentracija įtarpos kompleksų tirpale, μ g/mL
1	Acetonas	200	0,15095
2	Dichlormetanas	6000	0,00165
3	Heksanas	600	0,00309
4	Etanolis	30	0,00104

RP-HPLC metodu nustatyta, kad didžiausia β K koncentracija yra kompleksuose, gautuose į HCD tirpalą lašinant acetoninį β K tirpalą, todėl β K tirpinti pasirinktas šis tirpiklis.

Tada buvo renkama optimali sintezės temperatūra. Naudojant tokį kompleksavimo metodą reikalinga temperatūra, kuriai esant kuo efektyviau būtų nugarinamas tirpiklis ir vyktų kompleksacija. Acetono virimo temperatūra yra 56 °C, todėl kompleksavimas turi būti atliekamas artimoje temperatūroje. Bandymas buvo atliekamas įtarpos kompleksų sintezei naudojant 5 % HCD koncentracijos vandeninį tirpalą ir kompleksavimo procesą atliekant 65 arba 80 °C temperatūroje (6 lentelė).

6 lentelė. β K koncentracija β K-HCD tirpaluose, sintezę atliekant skirtingose temperatūrose. Įtarpos kompleksų sintezei naudotas 5 % HCD tirpalas ir acetoninis β K tirpalas

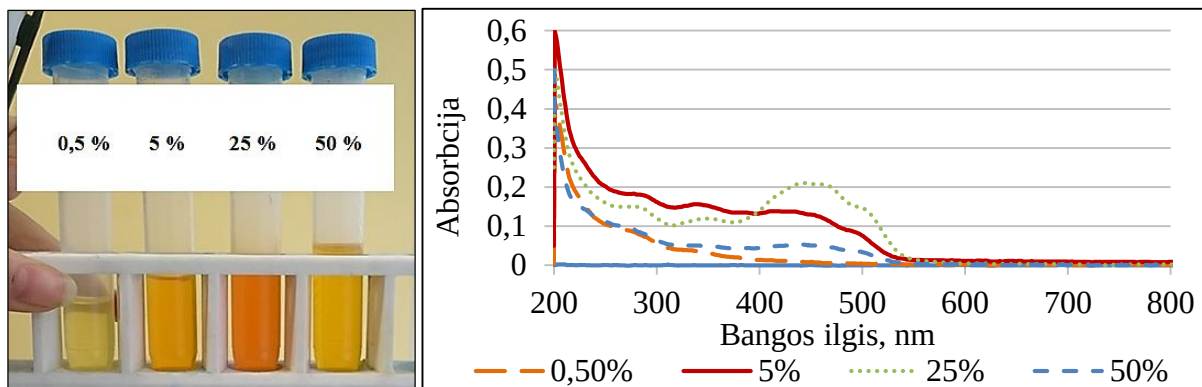
Nr.	Temperatūra	Koncentracija, μ g/mL
1	65 °C	0,19422
2	80 °C	0,01581

RP-HPLC metodu nustatyta, kad įtarpos kompleksų sintezę atliekant 65 °C temperatūroje β K koncentracija įtarpos kompleksuose yra apie 12 kartų didesnė, nei sintezę atliekant 80 °C temperatūroje. Buvo pastebėta, kad procesą atliekant aukštesnėje temperatūroje tirpalo paviršiuje susidaro β K agregatai – manoma, kad būtent dėl agregatų susidarymo kapsuliavimas vyksta ne taip efektyviai. Aukšta temperatūra gali sukelti β K degradaciją, todėl įtarpos kompleksų sintezei buvo pasirinkta naudoti žemesnė temperatūra.

3.1.3. Ciklodekstrino koncentracijos vandeniniame tirpale įtaka įtarpos kompleksų sintezei

Iš literatūros žinoma, kad nuo ciklodekstrino koncentracijos priklauso β K tirpumas, todėl įtarpos kompleksų sintezei išbandytos skirtingos HCD koncentracijos (Singh, 2016).

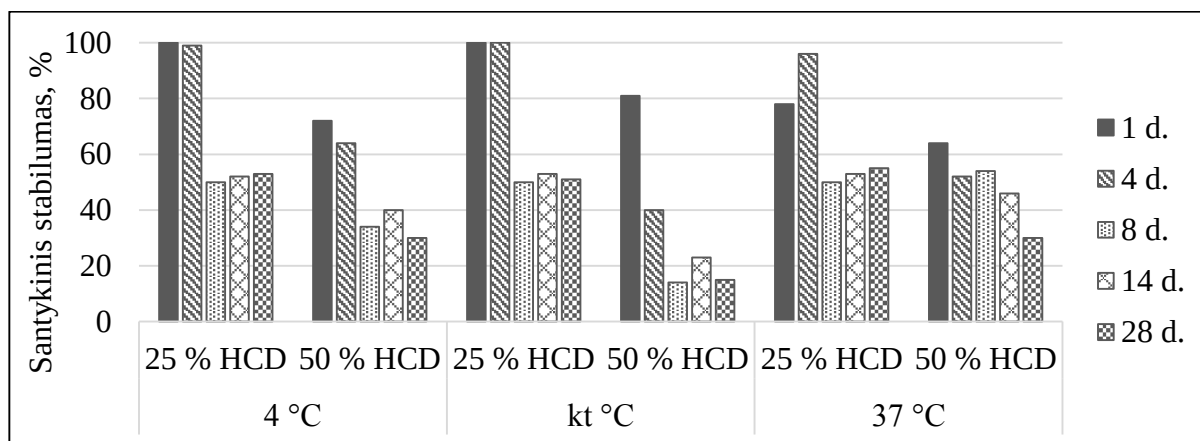
Įtarpos kompleksų sintezei naudoti 0,5; 5; 25 arba 50 % koncentracijos vandeniniai HCD tirpalai. Kompleksų vandeninių tirpalų UV-Vis spektrai pavaizduoti 11 paveiksle.



11 pav. β K-HCD, susintetintų naudojant 0,5; 5; 25 arba 50 % HCD tirpalus, UV-Vis spektrai ir kompleksų vandeninių tirpalų spalvos

Didžiausiu spalvos intensyvumu pasižymėjo įtarpos kompleksai, gauti sintezei naudojant 25 % HCD tirpalą, o mažiausiu – naudojant 0,5 % HCD tirpalą. β K-HCD kompleksų vandeniniai tirpalai laikyti 4 °C temperatūroje ir stebėti spalvų intensyvumo pokyčiai saugojimo metu. Per 30 dienų mažiausiai kito β K-HCD kompleksų tirpalų, gautų sintezei naudojant 25 arba 50 % HCD tirpalus, spalvos intensyvumas, todėl šios dvi HCD koncentracijos naudotos tolimesniems tyrimams.

Atrinkus dvi HCD koncentracijas įtarpos kompleksų sintezei, vandeniniai kompleksų tirpalai saugoti trejose temperatūrose: 4 °C, kambario ir 37 °C temperatūroje. Po tam tikro laiko (1, 4, 8, 14 ir 28 dienų) įtarpos kompleksai suardyti, nustatyta β K koncentracija ir apskaičiuotas santykinis β K stabilumas (12 pav.).

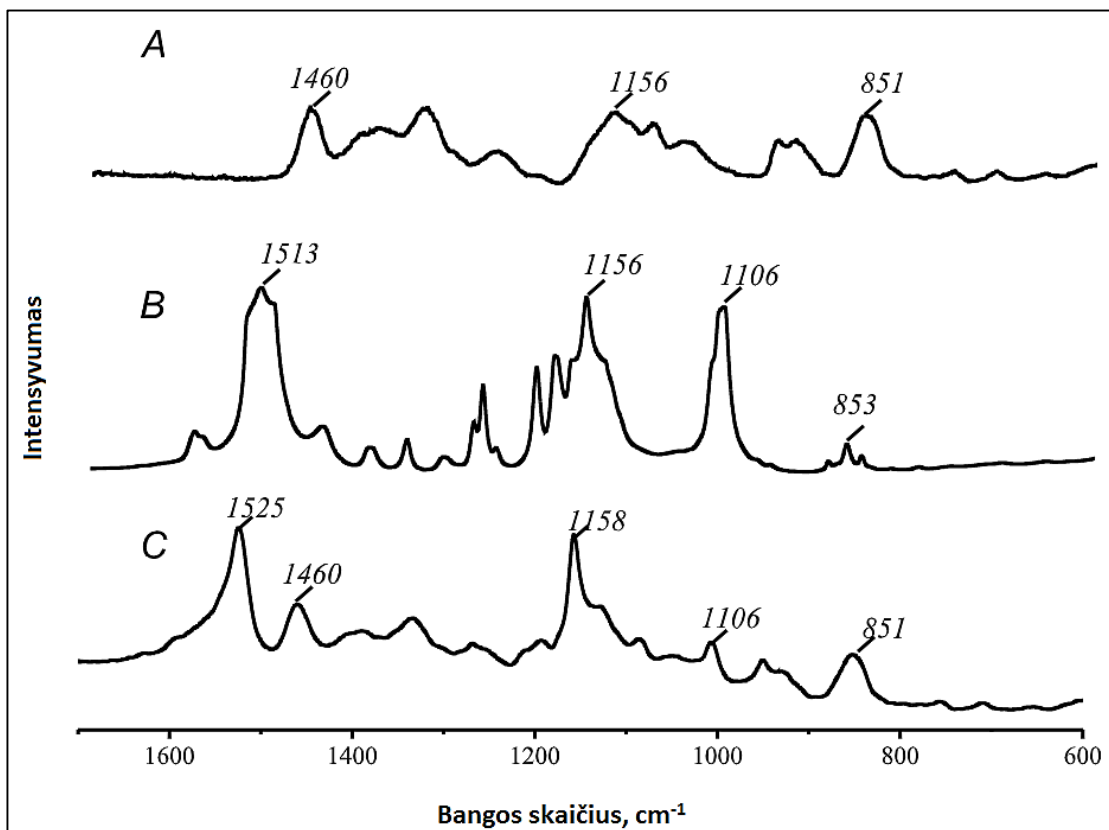


12 pav. β K, esančio β K-HCD, gautuose naudojant 25 arba 50 % HCD tirpalą, santykinis stabilumas saugojimo metu 4 °C, kambario ir 37 °C temperatūroje po 1, 4, 8, 14 ir 28 dienų

β -Karotenai geriau stabilumą išlaikė įtarpos kompleksuose, susintetintuose naudojant 25 % HCD tirpalą. Temperatūra, kurioje buvo saugomi įtarpos kompleksų vandeniniai tirpalai, didelės įtakos stabilumui neturėjo, tačiau dėl β -karoteno jautrumo temperatūrai bei šviesai, tolimesniuose tyrimuose mėginiai yra saugomi 4 °C temperatūroje tamsioje aplinkoje.

3.1.4. Įtarpos kompleksų charakterizavimas

Norint įsitikinti, kad β K tikrai pavyksta įterpti į 2-hidroksipropil- β -ciklodeskrino molekulės vidinę ertmę, atlikta Ramano spektroskopinė analizė. Liofilizuotų HCD, gryno β K ir įtarpos kompleksų Ramano spektrai palyginti 13 paveiksle.



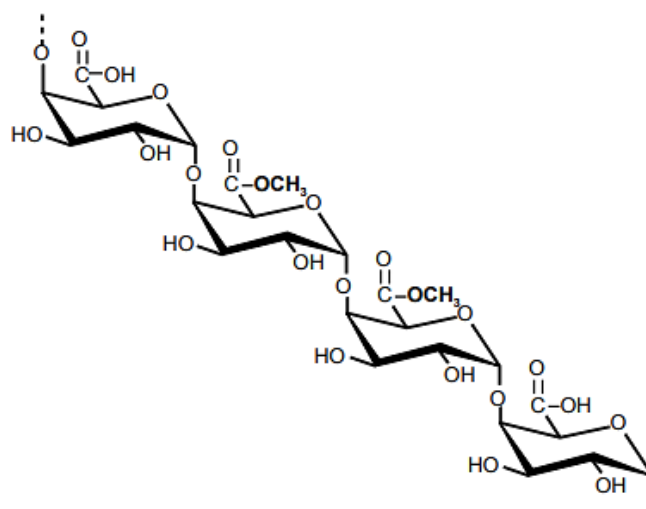
13 pav. HCD (A), gryno β K (B) ir β K-HCD (C) Ramano spektrai¹

β K būdingos trys intensyvios absorbcijos juostos ties, 1106 cm^{-1} (C-CH₃ ryšių virpesiai), 1156 cm^{-1} (C-C ryšių virpesiai) ir 1513 cm^{-1} (C=C ryšių virpesiai) (Tschirner, 2009). Įtarpos kompleksų Ramano spektruose matoma HCD būdinga absorbcijos juosta ties 1460 cm^{-1} , o β K būdinga absorbcijos juosta ties 1513 cm^{-1} įtarpos kompleksų spektre pasislinkusi į ilgujų bangų pusę (ties 1525 cm^{-1}) – šie rezultatai rodo, kad β K-HCD sintezė vyksta sėkmingai.

3.2. Trikomponenčių dalelių tyrimai

Nustačius optimalias įtarpos kompleksų sintezės sąlygas ir įsitikinus, kad sėkmingai pavyksta susintetinti β K-HCD kompleksus, jie papildomai dengti plačiai maisto pramonėje naudojamu pektinu (14 pav.).

¹ Už užrašytus Ramano spektrus dėkoju dr. Tatjanai Krivorotovai



14 pav. Pektino molekulė (Raj et al., 2012)

Pektinas – natūralioje aplinkoje egzistuojantis kompleksinis anijoninis polisacharidas, sudarytas iš α -(1,4)-D-galakturoninės rūgšties ir metilo esterio radikalų. Esterifikuotų ir neesterifikuotų galakturoninių rūgščių santykis nulemia pektino pritaikymą. Pektinas yra atsparus žemoms pH ir protezių bei amilazių skaidymui skrandyje, tačiau jautrus pektinazėms gaubtinėje žarnoje, todėl jis visiškai suskaidomas virškinamajame trakte. Dėl šių savybių pektinas naudojamas įvairių dalelių dengimui, kad būtų gautas kontroliuojamas aktyvios medžiagos atpalaidavimas. Taip pat dengimas pektinu papildomai apsaugo įkapsuliuotą medžiagą nuo oksidacijos ir degradacijos reakcijų (Raj, Rubila, Jayabalan and Ranganathan, 2012).

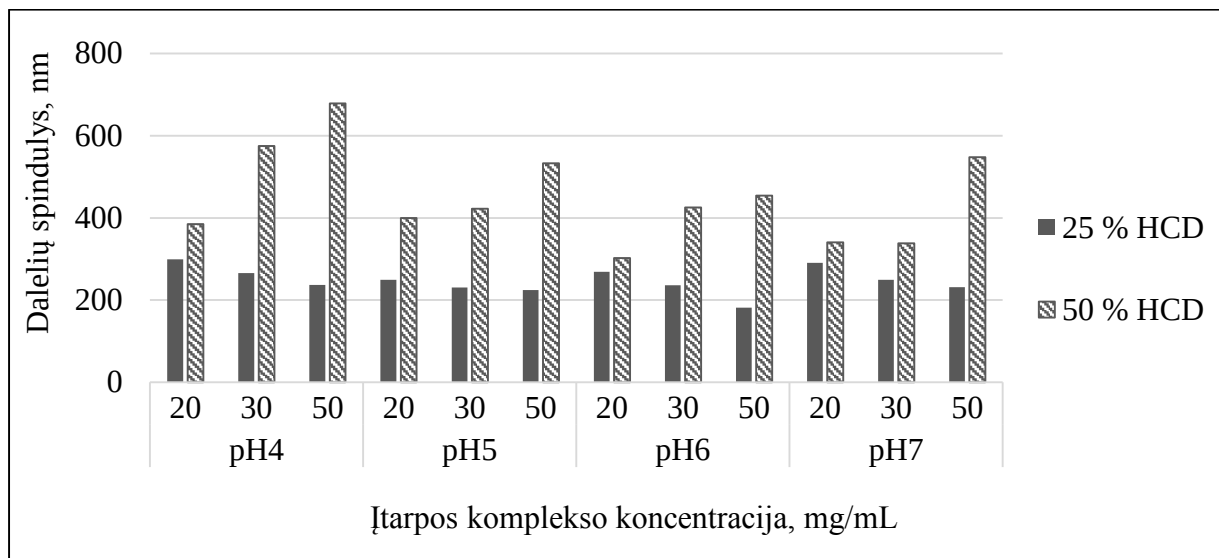
Įtarpos kompleksai dengiami trijų tipų pektinų (pektino rūgšties, žemo arba aukšto esterifikacijos laipsnio pektino) tirpalais, esant skirtingiems pH (4, 5, 6 arba 7). Atitinkamai gaunamos trikomponentės β K-HCD-pektino rūgšties (RG), β K-HCD-žemo esterifikacijos laipsnio pektino (ŽEL) ir β K-HCD-aukšto esterifikacijos laipsnio pektino (AEL) dalelės. Tyrimams ruošiamos trikomponentės dalelės, kurių tirpale pektino koncentracija yra pastovi (0,4 mg/mL), o įtarpos kompleksų koncentracija yra 20, 30 arba 50 mg/mL. Tiriama, kokią įtaką trikomponentinių dalelių dydžiui, stabilumui, trikomponentėse dalelėse esančio β K antioksidaciniam aktyvumui ir stabilumui (dalelės veikiant UV šviesa arba karščiu) turi dengimui naudoto pektino tipas, tirpalo pH ir β K-HCD koncentracija galutiniame dalelių tirpale.

3.2.1. Ciklodekstrino koncentracijos įtaka dalelių dydžiui ir β -karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse, stabilumui

Norint sumažinti mėginių skaičių ir nuspręsti, kurie įtarpos kompleksai yra tinkamesni trikomponentinių dalelių sintezei, įtarpos kompleksai, gauti sintezei naudojant 25 arba 50 % HCD tirpalą, dengti skirtingo pH žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalais ir nustatytas gautų

dalelių dydis bei jose esančio β K stabilumas, veikiant UV šviesa arba karščiu. Paruoštos trikomponentės dalelės, kuriose β K-HCD koncentracija yra 20, 30 arba 50 mg/mL.

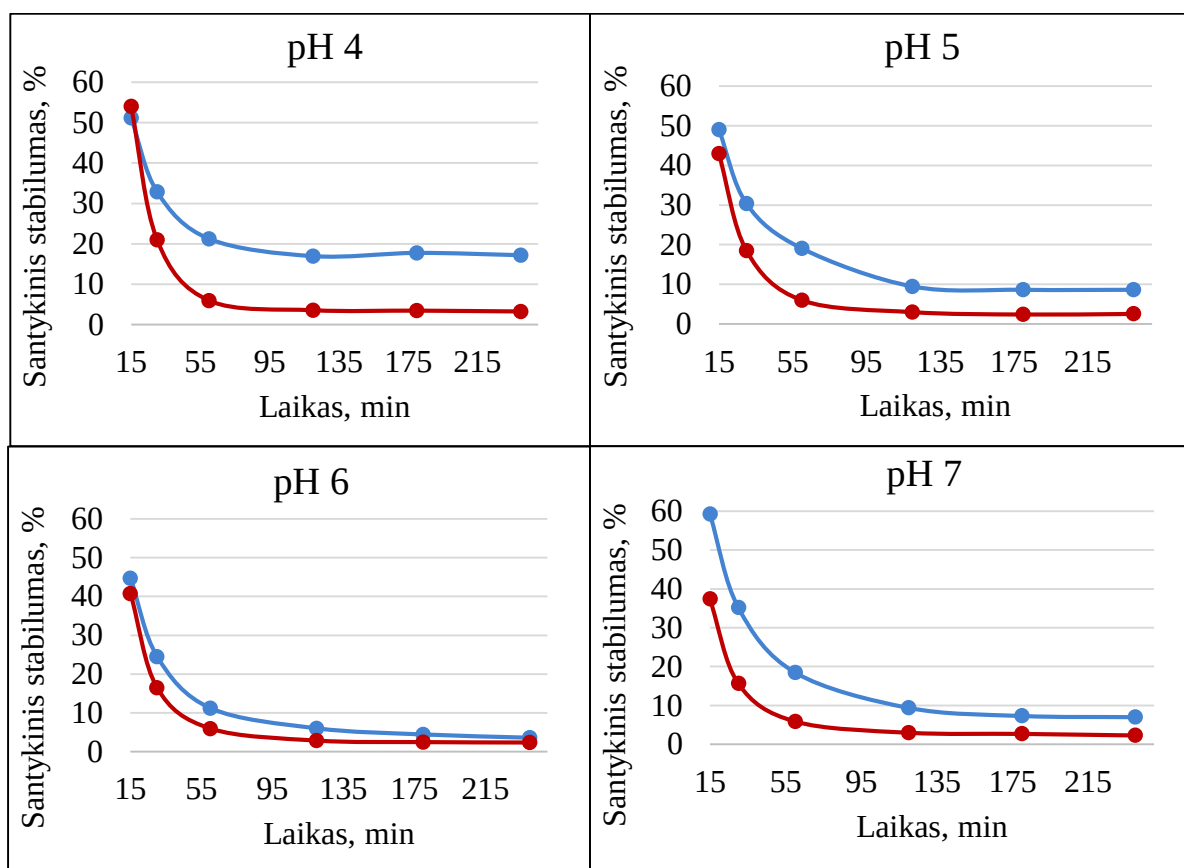
Dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodu nustatyti gautų trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių dydžiai (15 pav.).



15 pav. Trikomponenčių dalelių, gautų žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalu (pH 4, 5, 6, 7) dengiant β K-HCD, susintetintus naudojant 25 arba 50 % HCD tirpalus, dydžiai. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20, 30 arba 50 mg/mL

Didesnės dalelės gautos pektinu dengiant įtarpos kompleksus, kurių sintezei naudotas 50 % HCD tirpalas. Taip pat pastebėta, kad didesniu dydžiu pasižymi dalelės, kurių tirpale yra didesnė β K-HCD koncentracija. Tuo tarpu žemo esterifikacijos laipsnio pektinu dengiant įtarpos kompleksus, kurių sintezei naudotas 25 % HCD tirpalas, didesniu dydžiu pasižymi dalelės, kurių tirpale yra mažesnė β K-HCD koncentracija.

Trikomponentės dalelės, kuriose β K-HCD koncentracija yra 20 mg/mL, taip pat buvo veikiamos UV šviesa ir po tam tikro laiko (15, 30, 60, 120, 180 ir 240 minučių) išmatuota β K sugertis 450 nm bangos ilgyje bei apskaičiuotas trikomponentėse dalelėse esančio β K santykinis stabilumas (16 pav.).



16 pav. βK, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalu (pH 4, 5, 6, 7) dengiant βK-HCD, susintetintus naudojant 25 (mėlyna spalva) arba 50 % (raudona) HCD tirpalą, santykinis stabilumas veikiant UV šviesa. βK-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 mg/mL

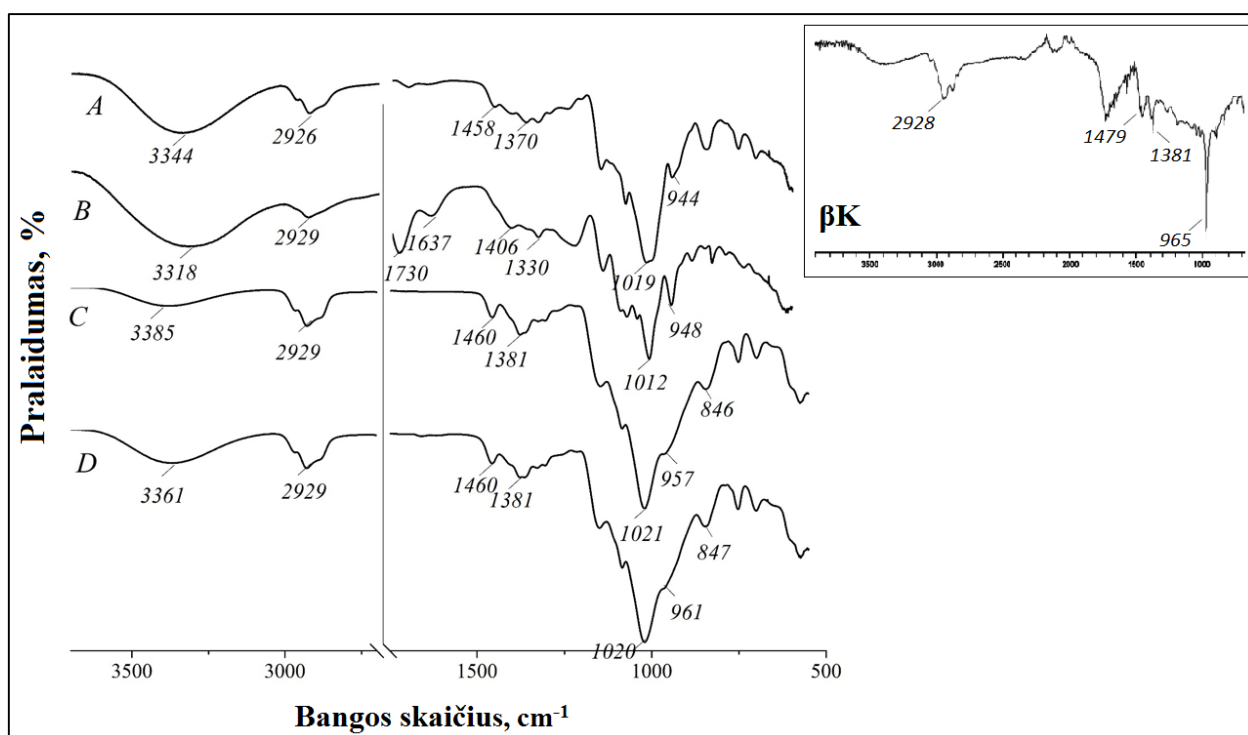
Gauti rezultatai rodo, kad nepriklausomai nuo dengimui naudojamo pektino tirpalo pH β-karotenas yra stabilesnis trikomponentėse dalelėse, gautose βK-HCD sintezei naudojant 25 % HCD tirpalą. Didžiausias skirtumas matomas tada, kai įtarpos kompleksų dengimui naudojamas žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalas, kurio pH yra 4 – po 3 valandų veikimo UV šviesa dalelėse, gautose įtarpos kompleksų sintezei naudojant 25 % HCD tirpalą, β-karoteno santykinis stabilumas yra apie 5 kartus didesnis nei dalelėse, gautose βK-HCD sintezei naudojant 50 % HCD tirpalą.

Tikslas yra gauti kuo mažesnes ir didesnius β-karoteno stabilumu pasižyminčias trikomponentes daleles, todėl, remiantis įtarpos kompleksuose esančio βK santykinio stabilumu saugojimo metu (12 pav.), β-karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse, santykinio stabilumu veikiant UV šviesa (16 pav.) ir trikomponentinių dalelių dydžių matavimais (15 pav.), išsamesniems trikomponentinių dalelių tyrimams ruošiamos dalelės, kur įtarpos kompleksų sintezei naudojamas 25 % HCD tirpalas.

3.2.2. Trikomponenčių dalelių stabilumas ir charakterizavimas

Norint įsitikinti, kad įtarpos kompleksai sėkmingai padengiami pektinu, atliktas įtarpos kompleksų ir trikomponenčių dalelių, gautų įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi, žemo ar aukšto esterifikacijos laipsnio pektinu, kurių tirpalų pH yra 4 arba 6, centrifugavimas, naudojant 10 kDa koncentravimo mėgintuvėlius (12000 ref, 15 min, 20 °C). Sėkmingo padengimo atveju po centrifugavimo mėgintuvėlio apačioje βK neturi būti, nes trikomponenčių dalelių svoris turi būti didesnis nei 10 kDa, todėl jos turi būti sulaikomos viršuje. Tuo tarpu jeigu liktų pektinu nepadengto komplekso arba laisvo βK, po centrifugavimo jie pereitų į mėgintuvėlio apačią. Po centrifugavimo atlikus viršutinių ir apatinių tirpalų ekstrakciją, užrašius UV-Vis spektrus ir apskaičiavus βK koncentraciją paaiškėjo, kad mėgintuvėlio apačioje βK nėra, vadinasi įtarpos kompleksų dengimas pektinu vyksta sėkmingai.

Taip pat norint įrodyti, kad βK-HCD tikrai padengiami pektinu, atlikta Furje transformacijos infraraudonųjų spindulių (FT-IR) spektroskopinė analizė. Liofilizuotų įtarpos kompleksų, trikomponenčių dalelių, 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrino, pektino rūgšties ir β-karoteno FT-IR spektrai palyginti 17 paveiksle.



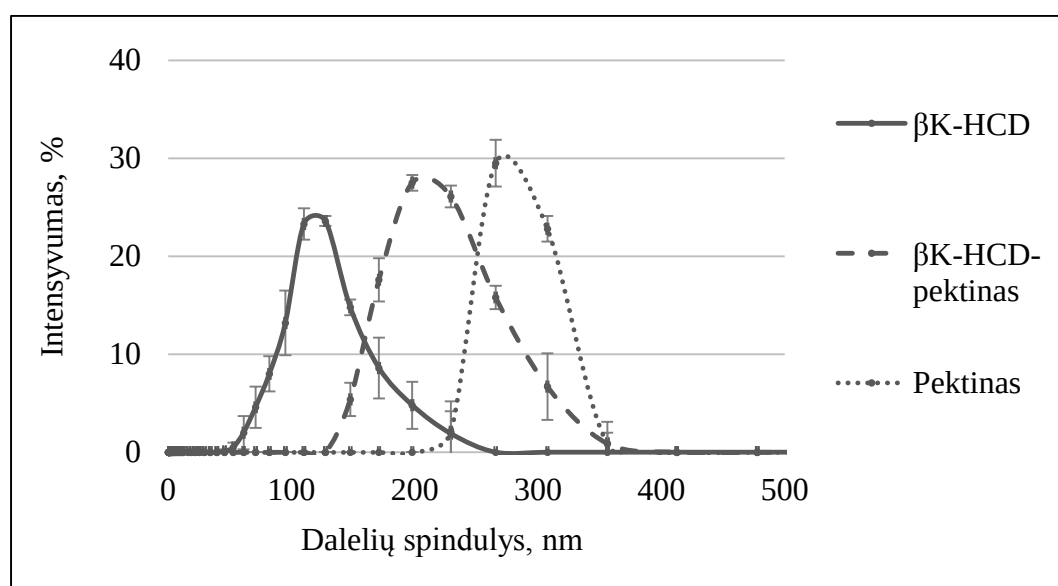
17 pav. HCD (A), pektino rūgšties (B), liofilizuotų βK-HCD (C), trikomponenčių dalelių (D) ir βK FT-IR spektrai²

βK FT-IR analizė anksčiau atlikta Celik'o ir jo komandos (17 pav. βK) (Celik, Bekdeser, Tufan and Apak, 2017). βK FT-IR spektrui būdingos absorbcijos juostos ties 2928 cm⁻¹ (C-H ryšių virpesiai), 1479 cm⁻¹ (C-C ryšių virpesiai), 1381 cm⁻¹ (CH₃ virpesiai) ir 965 cm⁻¹ (-

² Už užrašytus FT-IR spektrus dėkoju dr. Tatjanai Krivorotovai

HC=CH- ryšių virpesiai). β K molekulei būdinga konjuguotų C=C ryšių virpesių didelio intensyvumo juosta ties 965 cm^{-1} β K-HCD kompleksų bei trikomponenčių dalelių FT-IR spektruose neidentifikuota – tai rodo, kad β K įkapsuliuojamas į HCD ertmę. Kompleksavimasis taip pat įrodo tai, kad kompleksų ir trikomponenčių dalelių spektruose matomos HCD ir pektinui būdingos absorbcijos juostos ties $1020\text{--}1021\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C ryšio virpesiai). Komplexo ir trikomponenčių dalelių spektruose matomas grynai HCD ir pektinui būdingų absorbcijos juostų ties 944 ir 948 cm^{-1} , 1330 ir 1370 cm^{-1} ir 3318 ir 3334 cm^{-1} (O-H ryšių virpesiai) pasistūmimas į ilgujų bangų pusę. Tiek kompleksų, tiek trikomponenčių dalelių spektruose absorbcijos juosta ties 2929 cm^{-1} sutampa su β K, HCD ir pektino absorbcijos juotomis, nes kompleksavimosi metu C-H ryšiai yra paveikiami mažiausiai.

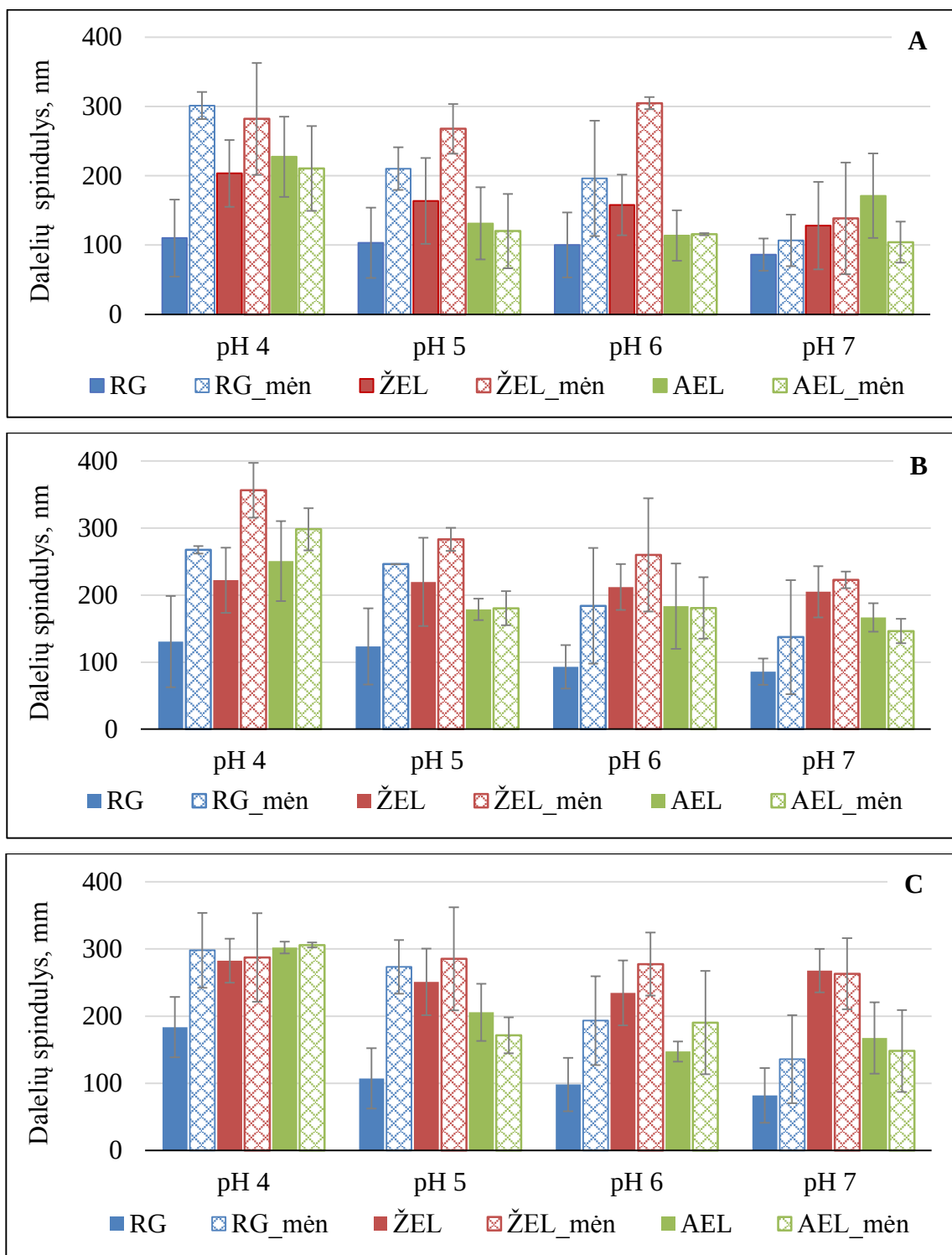
Trikomponenčių β K įkapsuliuotų dalelių formavimuisi pagrįsti taip pat panaudotas dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodas. Įtarpos kompleksų, trikomponenčių dalelių ir aukšto esterifikacijos laipsnio pektino dydžiai palyginti 18 paveiksle. Tyrimui naudotos trikomponentės dalelės, kurios gautos β K-HCD dengiant aukšto esterifikacijos laipsnio pektino tirpalu, kurio pH yra 4.



18 pav. β K-HCD, trikomponenčių dalelių (AEL) ir aukšto esterifikacijos laipsnio pektino dydžių pasiskirstymas. β K-HCD koncentracija galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale yra 20 mg/mL

Trikomponenčių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių dydis yra mažesnis nei aukšto esterifikacijos laipsnio pektino, tačiau didesnis nei įtarpos kompleksų – tai rodo, kad įtarpos kompleksai yra sėkmingai padengiami pektinu.

Naudojant DLS metodą taip pat nustatyti trikomponenčių dalelių dydžiai ir jų stabilumas, įvertinta, kokią įtaką jų dydžiui turi dengimui naudojamo pektino tipas, pH bei įtarpos kompleksų koncentracija galutiniame tirpale (19 pav.).

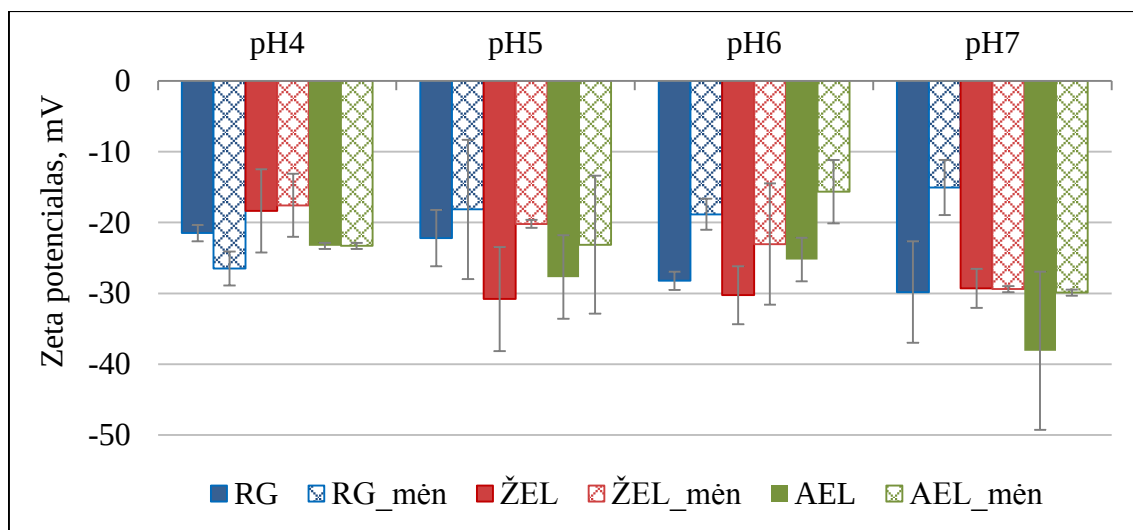


19 pav. Trikomponenčių β K įkapsuluotų dalelių, gautų β K-HCD dengiant pektinų tirpalais (pH 4, 5, 6, 7), dydžiai pradinio matavimo metu ir po mėnesio. β K-HCD koncentracija galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL

Visais atvejais, nepriklausomai nuo įtarpos kompleksų koncentracijos bei pektino tirpalų pH, mažiausios dalelės gautos įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi. Pektino tirpalo pH bei β K-HCD koncentracijos trikomponenčių dalelių tirpale įtaka dalelių dydžiui pastebėta tik tuo atveju, kai β K-HCD dengti pektino tirpalais, kurių pH yra 4. Didžiausias skirtumas matomas įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgšties tirpalu, kurio pH yra 4 –

didėjant įtarpos kompleksų koncentracijai galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale nuo 20 iki 50 mg/mL, dalelių dydis taip pat didėja (nuo 110 iki 184 nm). Pakartotinai atlikus dalelių dydžio matavimus po mėnesio pastebėta, kad nepriklausomai nuo dengimui naudojamo pektino esterifikacijos laipsnio bei įtarpos komplekso koncentracijos didžiausiu stabilumu pasižymi dalelės, gautos įtarpos kompleksus dengiant pektinų tirpalais, kurių pH yra 7.

Taip pat atlikti ką tik paruoštų ir mėnesį tamsoje 4 °C temperatūroje saugotų trikomponenčių dalelių tirpalų zeta potencialo matavimai (20 pav.).

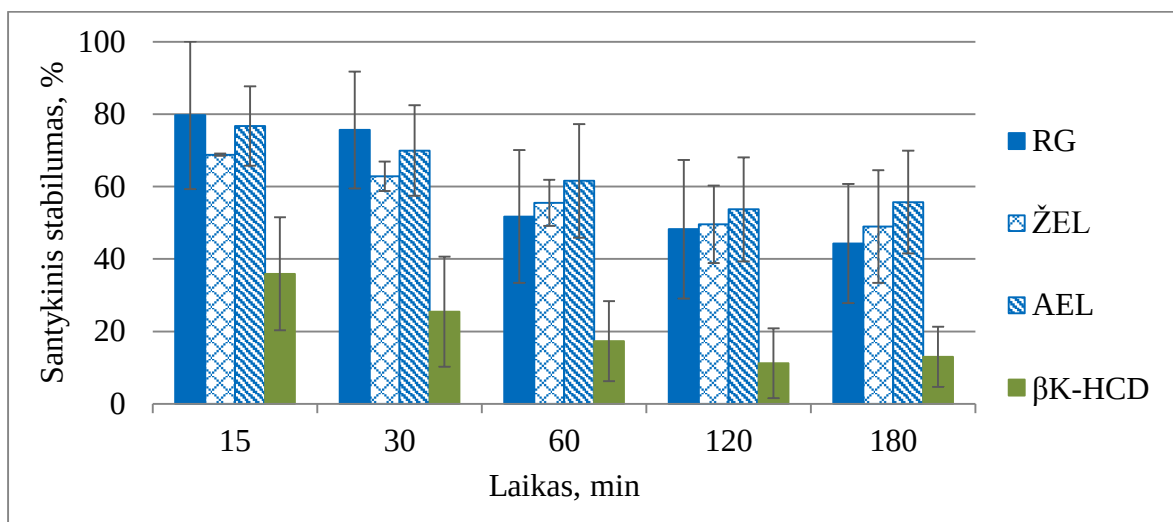


20 pav. Trikomponenčių βK įkapsuliuotų dalelių, gautų βK-HCD dengiant pektinų tirpalais (pH 4, 5, 6, 7), zeta potencialai pradinio matavimo metu ir po mėnesio. βK-HCD koncentracija galutiniame trikomponenčių dalelių tirpale yra 20 mg/mL

Dėl įtarpos kompleksų ir pektino kompleksavimosi, kurio metu mažėja paviršiuje esančių laisvų neigiamų krūvių, trikomponenčių dalelių zeta potencialai yra teigiamesni nei laisvo pektino, pavyzdžiui, pH 4 pektino rūgšties, žemo ir aukšto esterifikacijos laipsnio pektinų zeta potencialai atitinkamai yra -36,5; -34,4 ir -37,7, o trikomponenčių dalelių, gautų įtarpos kompleksus dengiant šiais pektinais, atitinkamai -21,5; -18,4 ir -23,3. Teigiamiausiu bei mažiausiai kintančiu zeta potencialu pasižymėjo mėginiai su trikomponentėmis dalelėmis, gautomis įtarpos kompleksus dengiant pektinų tirpalais, kurių pH yra 4.

3.2.3. Veikimas ultravioletine šviesa

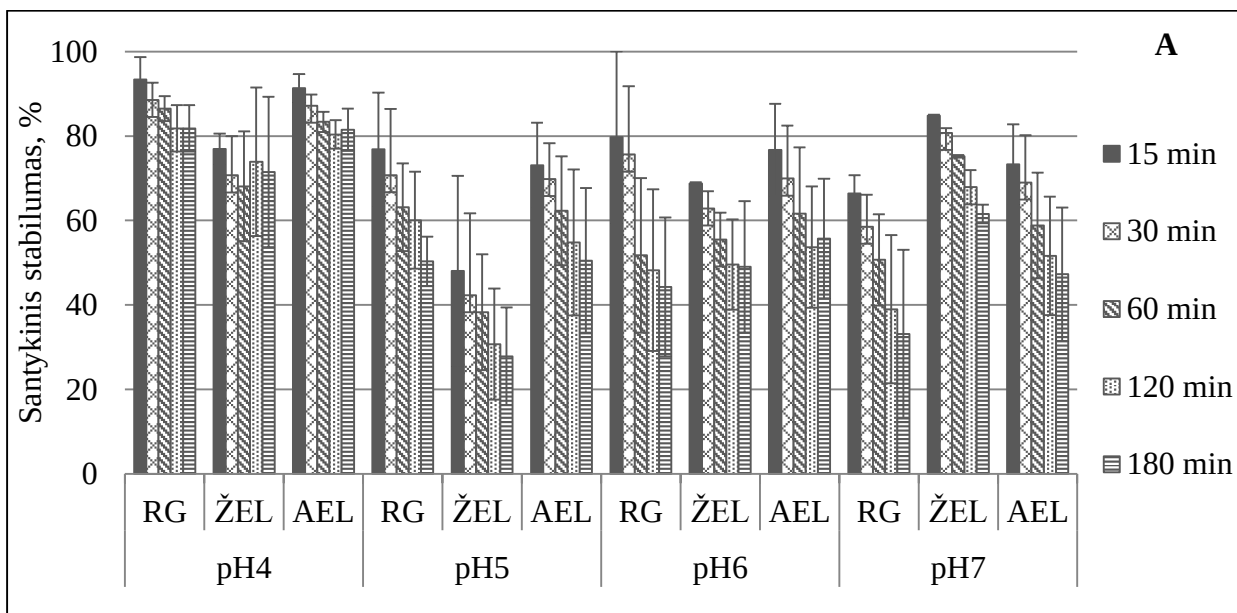
Norint palyginti β-karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse ir įtarpos kompleksuose stabilumą, mėginiai buvo veikiami UV šviesa ir po tam tikro laiko (15, 30, 60, 120 ir 180 minučių) UV-Vis metodu išmatuota sugertis 450 nm bangos ilgyje ir apskaičiuotas β-karoteno santykinis stabilumas (21 pav.). Kompleksai dengti skirtingo tipo pektinais, kurių tirpalų pH yra 6.

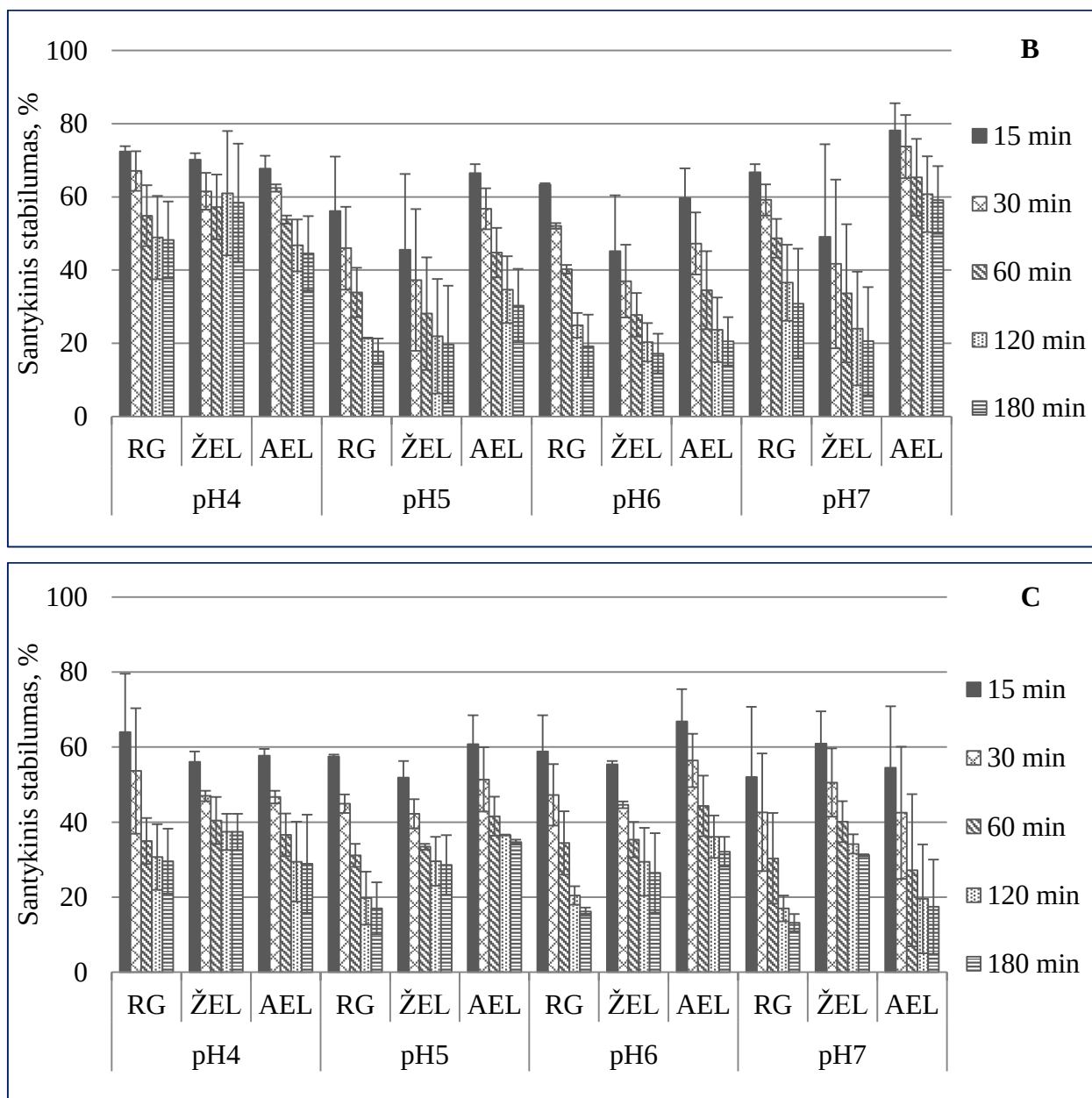


21 pav. βK, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose βK-HCD dengiant pektinų tirpalais (pH 6), arba βK-HCD, santykinis stabilumas, daleles veikiant UV šviesa. βK-HCD koncentracija galutiniame trikomponentių dalelių tirpale yra 20 mg/mL

Matoma, kad po 180 minučių poveikio UV šviesa β-karotenas, esantis trikomponentėse dalelėse, išlaiko net apie 32–43 % (priklausomai nuo dengimui naudoto pektino tipo) didesnę stabilumą, nei įtarpos kompleksuose. Tai rodo, kad papildomas įtarpos kompleksų dengimas pektinu βK suteikia didesnę stabilumą.

Taip pat nustatyta dengimui naudojamo pektino tipo, pH ir įtarpos komplekso koncentracijos galutiniame tirpale įtaka β-karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse, kurios yra veikiamos UV šviesa, stabilumui (22 pav.).





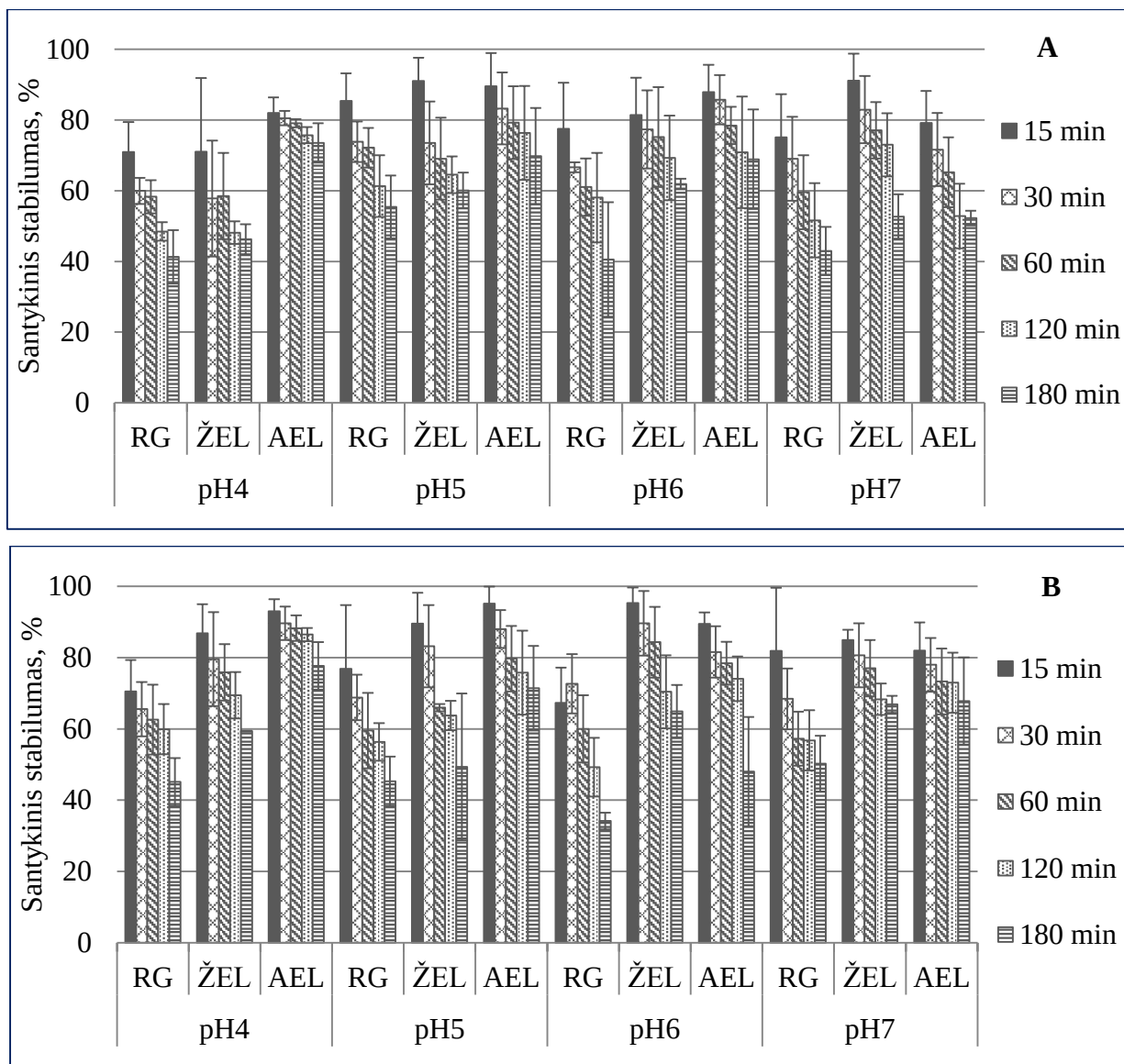
22 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo ir pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, santykinis stabilumas, daleles veikiant UV šviesa. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL

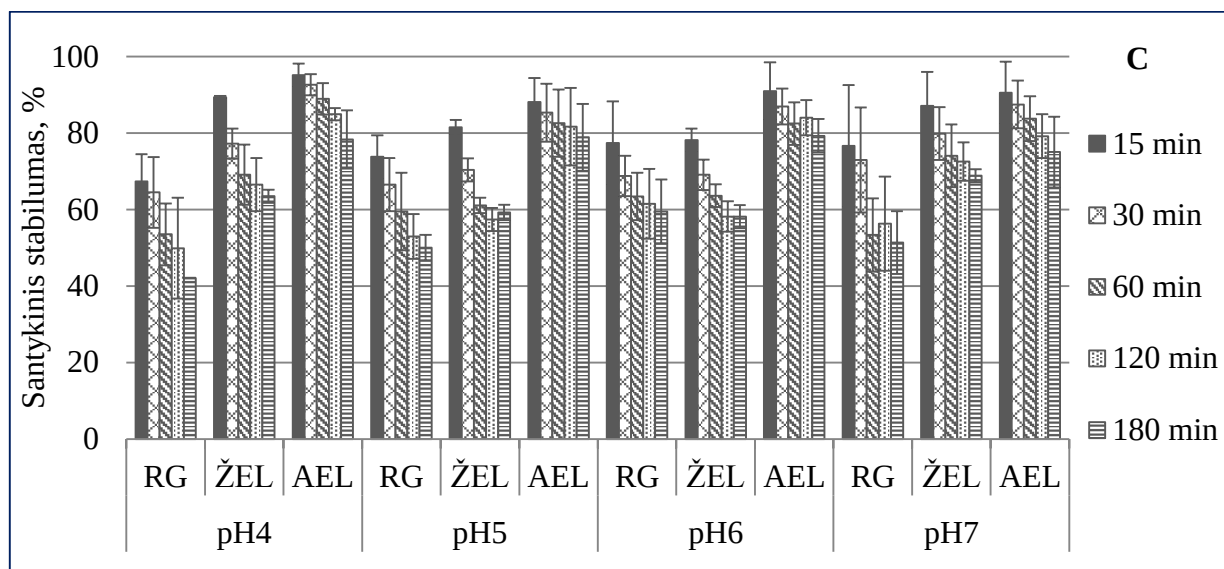
Gauti rezultatai rodo, kad β K, esantis trikomponentėse dalelėse, kurių tirpale β K-HCD koncentracija mažesnė, yra atsparesnis UV šviesai nei dalelėse, kurių tirpale β K-HCD koncentracija yra didesnė. UV šviesa veikiuose trikomponentėse dalelėse, kuriose įtarpos kompleksų koncentracija yra 50 mg/mL, esančio β K stabilumui pektinų tirpalų pH neturi – šiuos rezultatus patvirtino ir atlikta ANOVA analizė ($p > 0,05$). Tuo tarpu dalelėse, kuriose įtarpos kompleksų koncentracija yra 20 ir 30 mg/mL, β -karotenas geriau stabilumą išlaiko tada, kai įtarpos kompleksai dengiami pektinų tirpalais, kurių pH atitinkamai yra 5 ir 4. Iš literatūros žinoma, kad žemesnio esterifikacijos laipsnio pektinai yra greičiau degraduojami nei aukštesnio (Raj et al., 2012). Gauti rezultatai rodo, kad visais atvejais β -karotenas stabilumą mažiau išlaiko

dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi, o daugumoje atvejų geriausiai išlaiko dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant aukšto esterifikacijos laipsnio pektinu (7 iš 12 atvejų, kitais – žemo esterifikacijos laipsnio pektinu).

3.2.4. Terminis poveikis

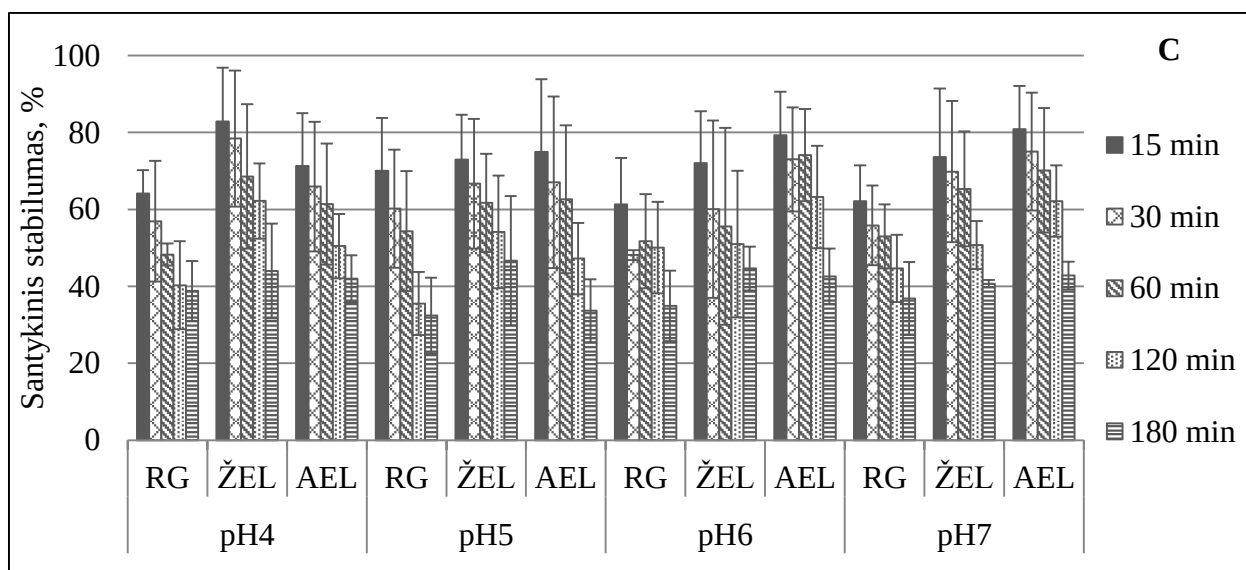
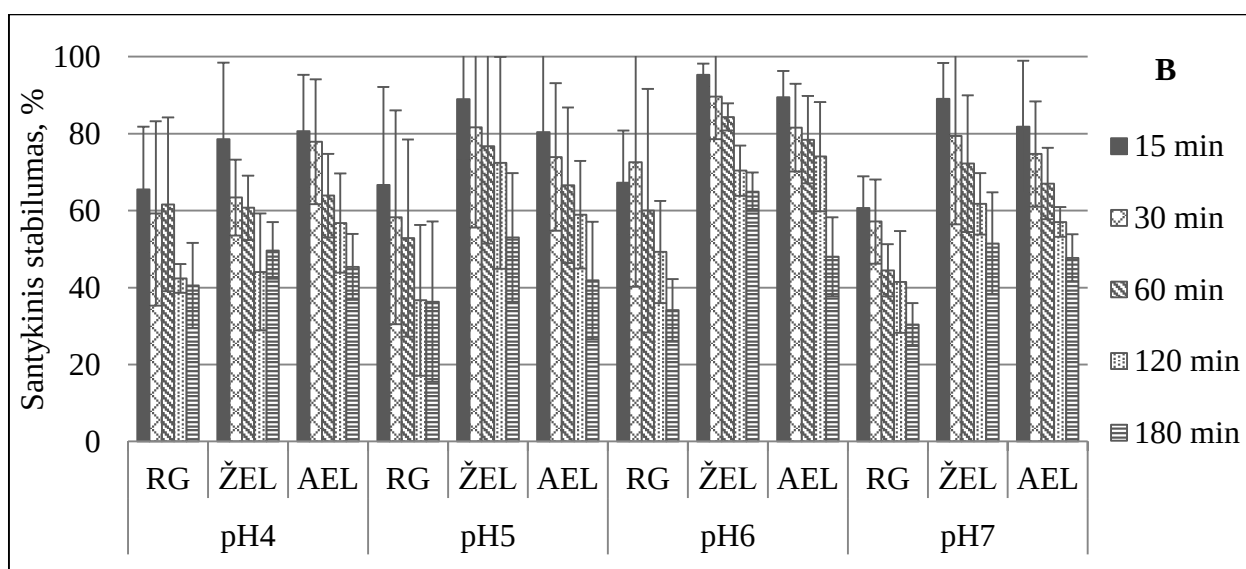
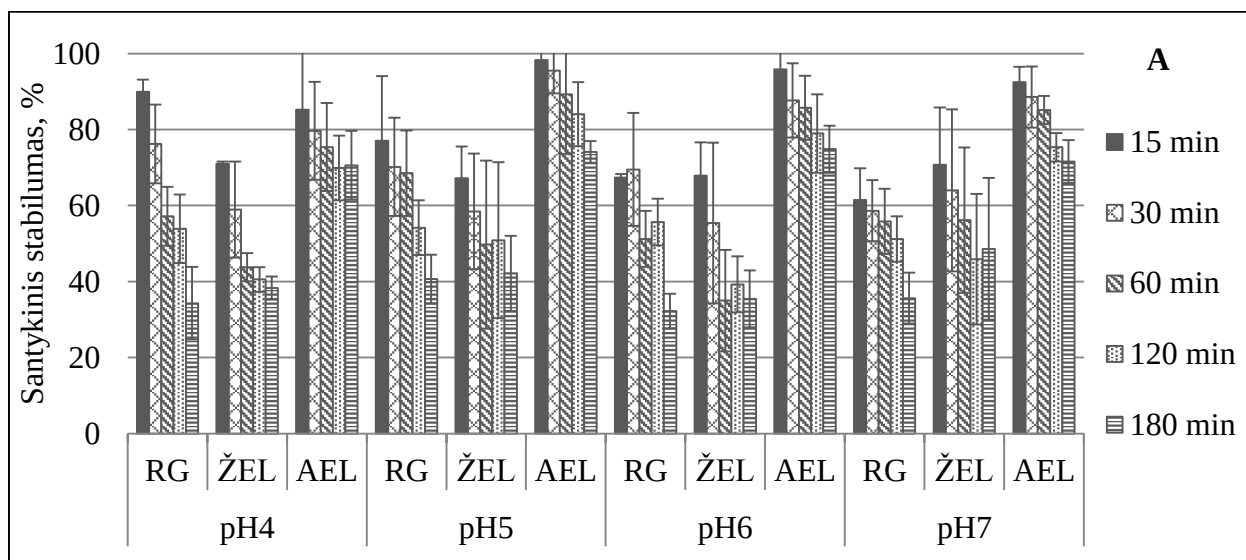
Nustatyta dengimui naudojamo pektino tipo, pH ir įtarpos komplekso koncentracijos galutiniame tirpale įtaka β K, esančio trikomponentėse dalelėse, kurios veikiamos 60 ir 95 °C temperatūra, stabilumui (23 ir 24 pav.).





23 pav. βK, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose βK-HCD dengiant skirtingo tipo ir pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, santykinis stabilumas, daleles veikiant 60 °C temperatūra. βK-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL

Pektino tipo, pH bei βK-HCD koncentracijos įtaka βK, esančio trikomponentėse dalelėse, kurios veikiamos 60 ir 95 °C temperatūra, santykiniam stabilumui yra panaši kaip ir UV poveikio atveju. Gauti rezultatai rodo, kad βK-HCD koncentracija trikomponentėse dalelėse, kurios veikiamos 60 °C temperatūra, neturi reikšmingos įtakos dalelėse esančio βK stabilumui – šiuos rezultatus patvirtino ir atlikta ANOVA analizė ($p > 0,05$). Dengimui naudojamų pektinų tirpalų pH įtaka βK, esančio trikomponentėse dalelėse, kurių tirpale įtarpos kompleksų koncentracija yra 50 mg/mL ir kurios yra veikiamos 60 °C temperatūra, stabilumui nepastebėta, tuo tarpu dalelėse, kuriose įtarpos kompleksų koncentracija yra 20 ir 30 mg/mL, β-karoteną geriau stabilumą išlaiko, kai įtarpos kompleksai dengiami pektinų tirpais, kurių pH atitinkamai yra 5 ir 4. Gauti rezultatai rodo, kad visais atvejais β-karoteną stabilumą mažiausiai išlaiko dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi, o daugumoje atvejų geriausiai išlaiko dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant aukšto esterifikacijos laipsnio pektinu (10 iš 12 atvejų, kitais – žemo esterifikacijos laipsnio pektinu).



24 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo ir pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, santykinis stabilumas, daleles veikiant 95 °C temperatūra. β K-HCD koncentracija galutiniame tirpale yra 20 (A), 30 (B) arba 50 (C) mg/mL

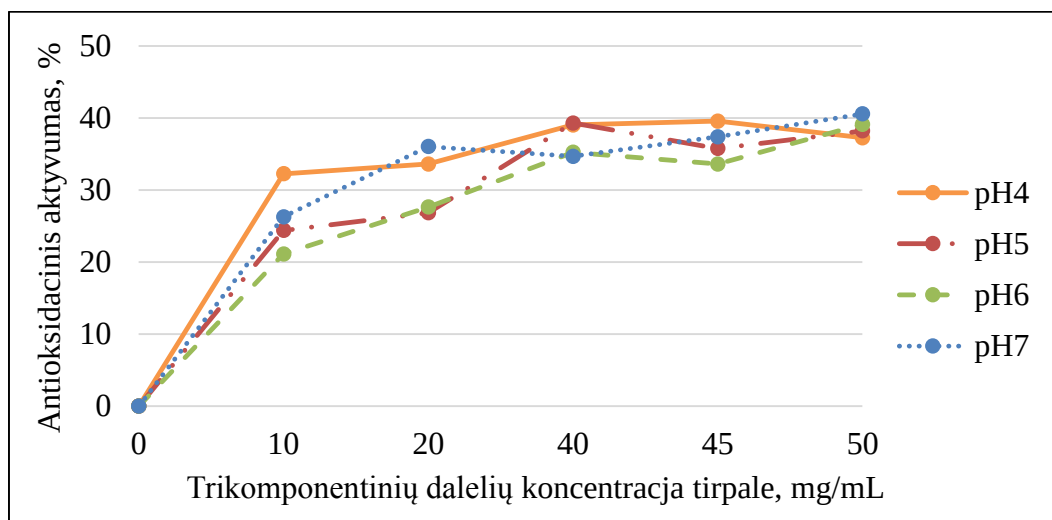
Gauti rezultatai rodo, kad β K, esantis trikomponentėse dalelėse, kurių tirpale β K-HCD koncentracija yra mažesnė, yra šiek tiek atsparesnis 95 °C temperatūrai nei dalelėse, kurių tirpale β K-HCD koncentracija yra didesnė. Trikomponentėse dalelėse, kurios veikiamos 95 °C temperatūra, esančio β K stabilumui įtarpos kompleksų dengimui naudoto pektino pH reikšmingos įtakos neturi – šiuos rezultatus patvirtino ir atlikta ANOVA analizė ($p > 0,05$). Gauti rezultatai rodo, kad visais atvejais β -karotenų stabilumą mažiausiai išlaiko dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi, o geriausiai išlaiko dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant žemo arba aukšto esterifikacijos laipsnio pektinu.

3.3. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai

Dėl savo labai reaktyvios elektronais praturtintos konjuguotų dvigubųjų ryšių sistemos β -karotenų pasižymi antioksidacinėmis savybėmis - gali veikti kaip laisvųjų peroksilo radikalų arba vienetinio molekulinio deguonies gaudyklė. Antioksidaciniam aktyvumui nustatyti naudojamas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) laisvojo radikalo metodas. Antioksidacinio aktyvumo tyrimams atlikti naudotos trikomponentės dalelės, kuriose įtarpos kompleksų koncentracija yra 50 mg/mL.

Pirmiausia atlikti tyrimai norint nustatyti laiką, reikalingą β K, esančiam trikomponentėse dalelėse pasiekti maksimalų antioksidacinį aktyvumą. Tyrimui naudotos dalelės, gautos įtarpos kompleksus dengiant skirtingo pH žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalais. Po tam tikro laiko (po 5, 10, 15, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240, 300 minučių ir 24 valandų) išmatuotos trikomponentinių dalelių vandeninių tirpalų sugertys 517 nm bangos ilgyje ir apskaičiuotas antioksidacinis aktyvumas. Maksimalų antioksidacinį aktyvumą β K pasiekė po 300 minučių, todėl šis laikas pasirinktas tolimesniems antioksidacinio aktyvumo tyrimams.

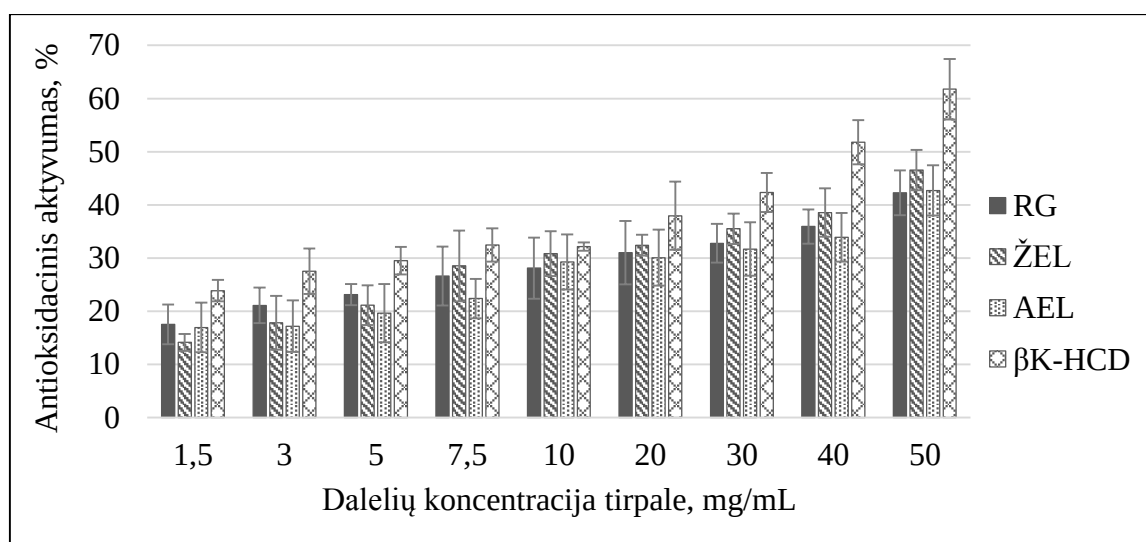
Taip pat buvo tiriama ar trikomponentėse dalelėse esančio β K antioksidaciniam aktyvumui įtakos turi įtarpos kompleksų dengimui naudojamų pektinų tirpalų pH (25 pav.). Tyrimui naudotos dalelės, kurios gautos įtarpos kompleksus dengiant skirtingo pH žemo esterifikacijos laipsnio pektino tirpalais.



25 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse (ŽEL), gautose β K-HCD dengiant skirtingo pH (4, 5, 6, 7) pektino tirpalais, antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo trikomponentinių dalelių koncentracijos tiriamajame tirpale

Gauti rezultatai rodo, kad pektino tirpalų pH įtakos β -karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse, antioksidaciniam aktyvumui neturi. Remiantis šiais ir anksčiau gautais β -karoteno santykinio stabilumo rezultatais, tolimesni antioksidacinio aktyvumo tyrimai atliekami su trikomponentėmis dalelėmis, kurios gaunamos įtarpos kompleksus dengiant skirtingais pektinais, kurių tirpalų pH yra 4.

Tada atlikti tyrimai, kurių metu nustatyta β -karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse ir įtarpos kompleksuose, antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo trikomponentinių dalelių arba įtarpos kompleksų koncentracijos tiriamajame tirpale (26 pav.).

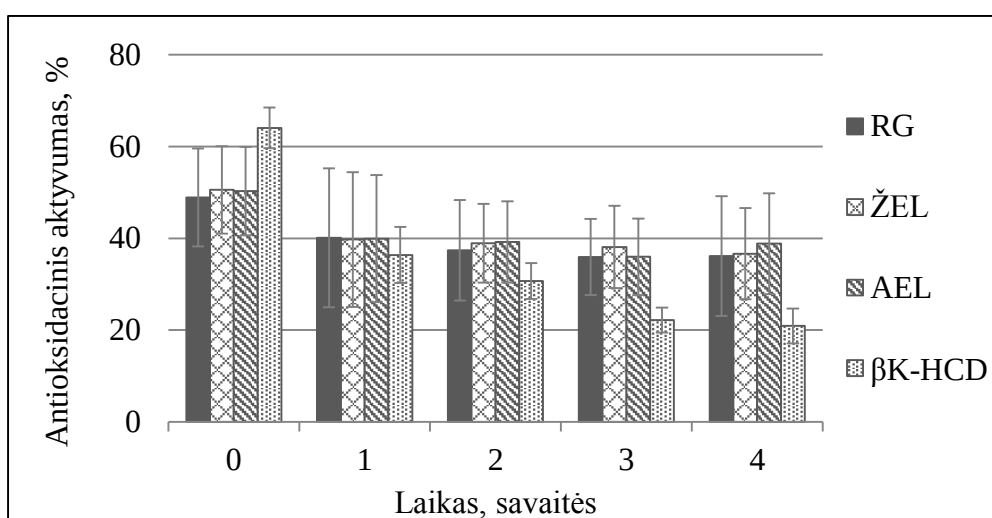


26 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo pektino tirpalais (pH 4), arba β K-HCD kompleksuose, antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo tikslinių dalelių koncentracijos tiriamajame tirpale

Trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengimui naudojant žemo esterifikacijos laipsnio pektiną, esantis β K pasižymi šiek tiek geresniu stabilumu nei dalelėse, gautose įtarpos

kompleksus dengiant pektino rūgštimi arba aukšto esterifikacijos laipsnio pektinu. Taip pat pastebėta, kad įtarpos kompleksuose esantis β K pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei trikomponentėse dalelėse – esant didžiausiai (50 mg/mL) dalelių koncentracijai tirpale, kompleksuose esantis β K pasižymi net apie 15–19 % didesniu antioksidaciniu aktyvumu, nei esantis trikomponentėse dalelėse. Trikomponentėse dalelėse esantis β K pasižymi mažesniu antioksidaciniu aktyvumu dėl to, kad įtarpos kompleksus papildomai dengiant pektinu, sumažėja β K galimybė sąveikauti su laisvaisiais radikalais.

Taip pat atlikti tyrimai, kurių metu nustatytas β -karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse ir įtarpos kompleksuose, antioksidacinio aktyvumo kitimas dalelių saugojimo metu (27 pav.).



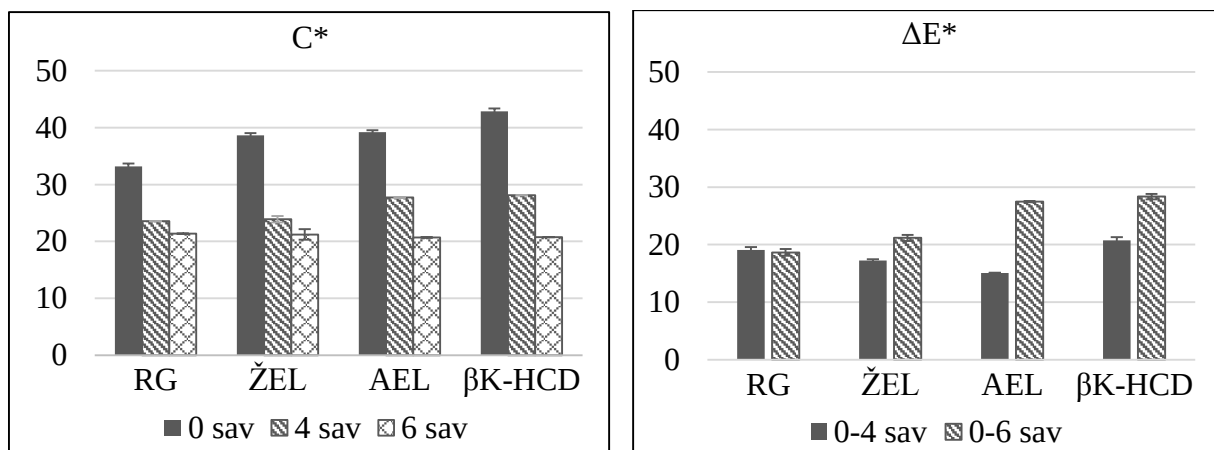
27 pav. β K, esančio trikomponentėse dalelėse, gautose β K-HCD dengiant skirtingo tipo pektino tirpalais (pH 4), arba β K-HCD kompleksuose, antioksidacinio aktyvumo kitimas saugojimo metu

Nustatyta, kad antioksidacinis aktyvumas labiausiai sumažėjo po 1 savaitės saugojimo – β -karotenas, esantis trikomponentėse dalelėse, praranda apie 8,9–10,9 % aktyvumo, o esantis įtarpos kompleksuose – net 27,7 % aktyvumo. Per kitas tris savaites β -karoteno, esančio trikomponentėse dalelėse, antioksidacinis aktyvumas sumažėja tik 1,1–4,0 %, o įtarpos kompleksuose – dar 15,5 %. Tai rodo, kad įtarpos kompleksus dengiant pektinu, trikomponentėse dalelėse esantis β -karotenas papildomai apsaugomas nuo žalingos aplinkos, todėl jis geriau išlaiko savo antioksidacinį aktyvumą ir kitas naudingas savybes.

3.4. Spalvos matavimai

Naudojant rankinį spektrofotometrą išmatuoti sausų įtarpos kompleksų ir trikomponentinių β -karotenu įkapsuliuotų dalelių, gautų įtarpos kompleksus dengiant pektino tirpalais, kurių pH yra 4, L^* , a^* ir b^* spalvų parametrai. Nustatytos reikšmės panaudotos

apskaičiuoti spalvos prisotinimui (C^*) ir bendram spalvų skirtumui (ΔE^*) bei įvertinti pokyčius saugojimo metu (28 pav.).



28 pav. Trikomponenčių dalelių, gautų βK-HCD dengiant skirtingo tipo pektino tirpalais (pH 4), arba βK-HCD kompleksų spalvos prisotinimo ir spalvų skirtumo kitimas saugojimo metu

Trikomponenčių dalelių, gautų įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi, žemo arba aukšto esterifikacijos laipsnio pektinu, bei įtarpos kompleksų miltelių spalvos prisotinimas (C^*) per 4 savaites sumažėjo atitinkamai 9,6; 14,7; 11,5 ir 14,9 vienetais, o dar po 2 savaitės – 2,2; 2,7; 7,0 ir 7,3 vienetais. Spalvos prisotinimo vertės mažėjimas rodo, kad mėginiai praranda spalvos ryškumą – per 6 savaites labiausiai spalvos ryškumas sumažėjo įtarpos kompleksų mėginiuose (22,1 vienetais). Mažesnis spalvos prisotinimo pokytis matomas trikomponenčių dalelių, kurios gauti įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi (11,8 vienetais), žemo (17,4) arba aukšto esterifikacijos laipsnio (18,5) pektinu, mėginiuose.

Esminių skirtumų tarp įtarpos kompleksų ir trikomponenčių dalelių spalvų skirtumo (ΔE^*) rezultatuose nėra, tačiau tarp 0 ir 6 savaitės kiek didesnis spalvų skirtumas matomas įtarpos kompleksų mėginiuose.

Apibendrinant galima teigti, kad siekiant gauti stabilesnes ir mažesniu dydžiu pasižyminčias trikomponentes βK įkapsuliuotas daleles įtarpos kompleksus reikėtų dengti pektino rūgšties tirpalu, kurio pH yra 7. Tuo tarpu norint gauti didesniu βK stabilumu pasižyminčias daleles, įtarpos kompleksus reikėtų dengti aukšto esterifikacijos laipsnio pektino tirpalu, kurio pH yra 4. Atlikti tyrimai taip pat rodo, kad įtarpos kompleksus papildomai dengiant pektinu pagerinama βK apsauga nuo aplinkos poveikio (UV šviesos, karščio) ir antioksidacinio aktyvumo išlaikymas saugojimo metu.

IŠVADOS

- 1) Pirmą kartą susintetintos ir ištirtos vandenyje tirpios trikomponentės β -karoteno-2-hidroksipropil- β -ciklodekstrino-pektino nanodalelės, kurios skiriasi įtarpos kompleksų koncentracija bei įtarpos kompleksų dengimui naudoto pektino tipu ir tirpalo pH.
- 2) Nustatyta, kad mažiausio dydžio buvo tos trikomponentės dalelės, kurios gautos įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgšties tirpalu, kurio pH yra 7. Didžiausiu stabilumu, nepriklausomai nuo pektino tipo ir kompleksų koncentracijos, pasižymėjo tos dalelės, kurios gautos įtarpos kompleksus dengiant pektinų tirpalais, kurių pH yra 7. Reikšminga įtarpos kompleksų koncentracijos įtaka dalelių dydžiui nenustatyta.
- 3) Visais atvejais mažesniu stabilumu (veikiant UV šviesa arba karščiu) pasižymėjo β -karotenas, esantis trikomponentėse dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant pektino rūgštimi. Pastebėta, kad tam tikrais atvejais β -karotenas didesniu stabilumu pasižymėjo dalelėse, gautose įtarpos kompleksus dengiant pektinų tirpalais, kurių pH yra mažesnis (4–5), ir kuriose yra mažesnė įtarpos kompleksų koncentracija.
- 4) Atlikus antioksidacinio aktyvumo ir UV šviesos poveikio tyrimus bei spalvos matavimus matoma, kad įtarpos kompleksus papildomai dengiant pektinu yra pagerinami β -karoteno stabilumo ir antioksidacinio aktyvumo išlaikymo rezultatai.



LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Age-Related Eye Disease Study Research Group. (2001). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, β -carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss. *Archives of Ophthalmol*, 119(10), 1417–1436.
- Anantachoke, N., Makha, M., Raston, C. L., Reutrakul, V., Smith, N. C. and Saunders, M. (2006). Fine Tuning the Production of Nanosized β -Carotene Particles Using Spinning Disk Processing. *Journal of American Chemical Society*, 128, 13847–13853.
- Anton, N. and Vandamme, T. (2010). Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978–985.
- Ariviani, S., Raharjo, S. and Anggrahini, S. (2015). Characterization and chemical stability evaluation of β -carotene microemulsions prepared by spontaneous emulsification method using VCO and palm oil as oil phase. *International Food Research Journal*, 22(6), 2432–2439.
- Basu, H. N. and Vecchio, A. D. (2001). Encapsulated carotenoid preparations from high-carotenoid canola oil and cyclodextrins and their stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(4), 375–380.
- Bogacz-Radomsk, L. and Harasym, J. (2018). β -Carotene – properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69–74.
- Bohm, F., Edge, R., Lange, L. and Truscott, T. G. (1998^A). Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 44(3), 211–215.
- Bohm, F., Edge, R., McGarvey, D. J. and Truscott, T. G. (1998^B). β -Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Letters*, 436(3), 387–389.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9(15), 1551–1558.
- Castenmiller, J. J. and West, C. E. (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 18, 19–38.
- Celik, S. E., Bekdeser, B., Tufan, A. N. and Apak, R. (2017). Modified radical scavenging and antioxidant activity measurement of β -carotene with β -cyclodextrins complexation in aqueous medium. *Analytical Sciences*, 33, 299–305.
- Chew B. P. and Park, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. *Journal of Nutrition*, 134(1), 257S–261S.
- Correa-Filho, L. C., Lourenco, M. M., Moldao-Martins, M. and Alves, V. D. (2019). Microencapsulation of β -carotene by spray drying: effect of wall material concentration and drying inlet temperature. *International Journal of Food Science*, 39, 1–12.

- Craft, N. E. (1992). Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 431–434.
- De Limo, P. N., Silva Dias, D., Costa, V. G., Falcao, D. Q. and de Lima Araujo, K. G. (2016). Increasing solubility of red bell pepper carotenoids by complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 208, 124–131.
- De Oliveira, V. E., Almeida, E. W. C., Castro, H. V., Edwards, H. G. M., Dos Santos, H. F. and de Oliveira, L. F. (2011). Carotenoids and β -cyclodextrin inclusion complexes: raman spectroscopy and theoretical investigation. *The Journal of Physical Chemistry*, 115, 8511–8519.
- Donhowe, E. G. and Kong, F. (2014). β -Carotene: digestion, microencapsulation and *in vitro* bioavailability. *Food and Bioprocess Technology*. 7(2), 338–354.
- Dugas, T. R., Morel, D. W. and Harrison, E. H. (1999). Dietary supplementation with β -carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell mediated oxidation of LDL lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1238–1244.
- Dutta, D., Dutta, A., Raychaudhuri, U. and Chakraborty, R. (2006). Rheological characteristics and thermal degradations kinetics of β -carotene in pumpkin puree. *Journal of Food Engineering*, 76(4), 538–546.
- Eitenmiller, R. R., Landen, W. O. and Ye, L. (2007). *Vitamin Analysis for The Health and Food Sciences* (2 ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Ekambaram, P., Sathali, A. A. H. and Priyanka, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: a review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(1), 80–102.
- Fuciman, M., Chabera, P., Zupcanova, A., Hribek, P., Arellano, J. B., Vacha, F. Psencik, J. and Polivka, T. (2010). Excited state properties of aryl carotenoids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(13), 3112–3120.
- Gomes, L. M. M., Petito, N., Costa, V. G., Falcao, D. Q. and de Lima Araujo, K. G. (2014). Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. *Food Chemistry*, 148, 428–436.
- Gul, K., Afshan, T., Singh, A. K., Singh, P., Yousuf, B. and Wani, A. A. (2015). Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene – a review. *Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 1–12.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A. and Doyle, P. S. 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12, 2826–2841.
- Gutierrez, F. J., Albillos, S. M., Casas-Sanz, E., Cruz, Z., Garcia-Estrada, C., Garcia-Guerra, A., Garcia-Reverter, J., Garcia-Suarez, M., Gatón, P., Gonzalez-Ferrero, C., Olabarrieta, I., Olasagasti, M., Rainieri, S., Rivera-Patino, D., Rojo, R., Romo-Hualde, A., Saiz-Abajo M. and

- Mussons, M. (2013). Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*, 32, 73–83.
- Harrison, E. H. (2012). Mechanism involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(1), 70–77.
- Haskell, M. J. (2012). The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A: β -carotene bioavailability and conversion – evidence in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(5), 1193S–1203S.
- Hedren, E., Diaz, V. and Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(5), 425–430.
- Heinrich, U., Gartner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H. and Stahl, W. (2003). Supplementation with β -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *Journal of Nutrition*, 133(1), 98–101.
- Hejri, A., Khosravi, A., Gharanjig, K. and Hejazi, M. (2013). Optimization of the formulation of beta-carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. *Food Chemistry*, 141, 117–123.
- Helgason, T., Awad, T. S., Kristbergsson, K., Decker, E. A., McClements, D. J. and Weiss, J. (2009). Impact of surfactant properties on oxidative stability of β -carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8033–8040.
- Hentschel, A., Gramdorf, S., Muller, R. H. and Kurz, T. 2008. β -Carotene loaded nanostructured lipid carriers. *Journal of Food Science*, 73(2), N1–N6.
- Hurst, W. J. (2002). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* (2 ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Young, A. J. and Lowe, G. L. (2018). Carotenoids – antioxidant properties. *Antioxidants (Basel)*, 7(2), 28–32.
- Jo, Y. and Kwon, Y. (2014). Characterization of β -carotene nanoemulsions prepared by microfluidization technique. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 107–113.
- Karangwa, E., Hayat, K., Rao, L., Nshimiyimana, D. S., Foh, M. B. K., Ntwali, J., Raymond, L. V., Xia, S. and Zhang, X. (2011). Improving blended carrot-orange juice quality by the addition of cyclodextrins during enzymatic clarification. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2612–2617.
- Kaur, M., Bawa, M. and Singh, M. (2016). β -Carotene- β -cyclodextrin inclusion complex: towards enhanced aqueous solubility. *Journal of Global Biosciences*, 5(2), 3665–3675.
- Kim, J., Seo, T. and Lim, S. (2013). Preparation of aqueous dispersion of β -carotene nanocomposites through complex formation with starch dextrin. *Food Hydrocolloids*, 33, 256–263.

- Kiokias, S. and Gordon, M. H. (2004). Antioxidant properties of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *Food Reviews International*, 20(2), 99–121.
- Kong, L., Bhosale, R., Ziegler, G. (2018). Encapsulation and stabilization of β -carotene by amylose inclusion complexes. *Food Research International*, 105, 446–452.
- Latowski, D., Szymanska, R. and Strzalka, K. (2014). Carotenoids involved in antioxidant system of chloroplasts. In P. Ahmad, *Oxidative Damage to Plants – Antioxidant Networks and Signaling* (pp. 289–319). Massachusetts: Academic Press.
- Liang, R., Huang, Q., Ma, J., Shoemaker, C. F. and Zhong, F. (2013). Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried β -carotene nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 33, 225–223.
- Lima Petito, N., Silvia Dias, D., Costa, V. G., Falcao, D. Q. and de Lima Araujo, K. G. (2016). Increasing solubility of red bell pepper carotenoids by complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 208, 124–131.
- Liu, Y. (2014). Starch-pectin matrices for encapsulation of ascorbic acid. *Dissertations, Theses and Student Research in Food Science and Technology*, 41, 1–89.
- Lockwood, S. F., O'malley S. and Mosher, G. L. (2003). Improved aqueous solubility of crystalline astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) by Captisol® (sulfobutyl ether β -cyclodextrin). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(4), 922–926.
- Makha, M., McKinnon, I. R. and Raston, C. L. (2002). Synthesis and trans- β -carotenoid inclusion properties of a new class of water soluble calixarenes. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*, 11, 1801–1806.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter*, 8, 1719–1729.
- Mele, A., Mendichi, R. and Selva, A. (1998). Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with trans- β -carotene in water: evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 310, 261–267.
- Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S. and Bolhassani, A. (2016). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1290–1324.
- Moharram, H. A. and Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31–42.
- Moraes, M., Carvalho, J. M. P., Silva, C. R., Cho, S., Sola, M. R. and Pinho, S. C. (2013). Liposomes encapsulating β -carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 474–282.

- Morowvat, M. H. and Ghasemi, Y. (2016). Spray-drying microencapsulation of β -carotene contents in powdered *Dunaliella salina* biomass. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(11), 1533–1536.
- Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 238–250.
- Naz, M. Y. and Sulaiman, S. A. (2016). Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review. *Journal of Controlled Release*, 225, 109–120.
- Olson, J. A. (1989). Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene to vitamin A. *Journal of Nutrition*, 119(1), 105–108.
- Palozza, P. and Krinsky, N. I. (1992). β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297(1), 184–187.
- Penicaud, C., Achir, N., Dhuique-Mayer, C., Dornier, M. and Philippe, B. (2011). Degradation of β -carotene during fruit and vegetable processing or storage: reaction mechanisms and kinetic aspects: a review. *Fruits*, 66(6), 417–440.
- Pool-Zobel, B. L., Bulb, A., Muller, H., Wollowski, I. and Rechkemmer, G. (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18(9), 1847–1850.
- Prakash, D. and Gupta, C. (2014). Carotenoids: chemistry and health benefits. In D. Prakash and G. Sharma, *Phytochemicals of Nutraceutical Importance* (pp. 181–195). Wallingford: CABI.
- Przybylski, M. A., Onacik-Gur, S., Majtczak, K. and Dłuzewska, E. (2016). The stability of spray-dried microencapsulated β -carotene in the mixture of gum arabic, o-sa-type modified starch and maltodextrin. *Italian Journal of Food Science*, 28, 716–732.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H. and McClements, D. J. (2013). Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Research International*, 52, 342–349.
- Raj, A. S., Rubila, S., Jayabalan, R. and Ranganathan, T. V. (2012). A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Open Access Scientific Reports*, 1(12), 1–4.
- Rao A. V. and Rao L. G. (2007). Carotenoids in human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216.
- Re, M. I. (2007). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology: An International Journal*, 16(6), 1195–1236.
- Rock, C. L., Lovalvo, J. L., Emenhiser, C., Ruffin, M. T., Flatt, S. W. and Schwartz, S. J. (1998). Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *Journal of Nutrition*, 128(5), 913–916.

- Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids – a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726–740.
- Roohinejad, S., Oey, I., Wen, J., Lee, S. J., Everett, D. W. and Burritt, D. J. (2015). Formulation of oil in water β -carotene microemulsions: effect of oil type and fatty acid chain length. *Food Chemistry*, 174, 270–278.
- Rudometova, N. V., Kulishova, K. E. and Kim, I. S. (2018). The influence of cyclodextrin and modified starches on the β -carotene lightfastness in inclusion complexes. *Scientific Journal NRU ITMO*, 3, 3–11.
- Santos, D. T. and Meireles, M. A. A. (2010). Carotenoid pigments encapsulation: fundamentals, techniques and recent trends. *The Open Chemical Engineering Journal*, 4, 42–50.
- Santos, P., Watkinson, A. C., Hadgraft, J. and Lane, M. E. (2008). Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology*, 21, 246–259.
- Schmitz, H. H., Poor, C. L., Wellman, R. B. and Erdman, J. W. (1991). Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *Journal of Nutrition*, 121(10), 1613–1621.
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., Coimbra, J. S. R., Carneiro-da-Cunha, M. G. and Vicente, A. A. (2011). Nanoemulsions of β -carotene using a high energy emulsification-evaporation technique. *Journal of Food Engineering*, 102, 130–135.
- Singh, M. (2016). β -Carotene- β -cyclodextrin inclusion complex: towards enhanced aqueous solubility. *Journal of Global Biosciences*, 5(2), 3665–3675.
- Stahl, W. and Sies, H. (2004). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351.
- Stoker, H. S. (2012). *Organic and Biological Chemistry* (7 ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Stutz, H., Bresgen, N. and Eckl, P. M. (2015). Analytical tools for the analysis of β -carotene and its degradation products. *Free Radical Research*, 49(5), 650–680.
- Šalkauskas, E. (2015). Flavonoidų fenolinių junginių kiekybinis nustatymas iš antioksidacinio aktyvumo tyrimas vaistinių medetkų žieduose. *Magistro baigiamasis darbas*. Kaunas: LSMU.
- Tan, C. P. and Nakajima, M. (2005). β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 92, 661–671.
- Tang, G. (2010). Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1468S–1473S.

- Tee, E. S. (1995). The medical importance of vitamin A and carotenoids and their determination. *Malaysian Journal of Nutrition*, 1(2), 179–230.
- Terao, J. (1989). Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24(7), 659–661.
- Triplet II, M. D. and Rathman, J. F. (2009). Optimization of β -carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using high shear homogenization techniques. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 601–614.
- Trombino, S., Cassano, R., Muzzalupo, R., Pingitore, A., Cione, E. and Picci, N. (2009). Stearyl ferulate based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of β -carotene and tocopherol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72, 181–187.
- Troncoso, E., Aguilera, J. M. and McClements, D. J. (2011). Development of nanoemulsions by an emulsification-evaporation technique. In *Food process engineering in a changing world: proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11)* (pp. 929–935). Athens: ICEF.
- Tschirner, N., Schenderlein, M., Brose, K., Schlodder, E., Mrogiński, M. A., Thomsen, C. and Hildebrandt, P. (2009). Resonance Raman spectra of β -carotene in solution and in photosystems revisited: an experimental and theoretical study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11, 11471–11478.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. and Stahl, W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 880–912.
- Varzakas, T. and Kiokias, S. (2016). HPLC analysis and determination of carotenoid pigments in commercially available plant extracts. *Current Research In Nutrition and Food Science*, 4(1), 1–4.
- Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T. and Awad, T. (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3, 146–154.
- Zaibunnisa, A. H., Aini Marhanna, M. N. A. and Ainun Atirah, M. (2011). Characterisation and solubility study of γ -cyclodextrin and β -carotene complex. *International Food Research Journal*, 18(3), 1061–1065.
- Zhou, H., Jiang, L., Zhang, Y. and Li, J. (2012). β -Cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization, and its aspirin release *in vitro*. *Frontiers of Materials Science*, 6(3), 259–267.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei dr. Rūtai Gruškienei už galimybę atlikti baigiamąjį magistro darbą VGTU molekulinės biotechnologijos laboratorijoje, pagalbą bei patarimus. Taip pat dėkoju savo darbo konsultantei doc. dr. Jolantai Sereikaitei už suteiktas žinias ir dr. Tatjanai Krivorotovai už užrašytus Ramano bei FT-IR spektrus.