

# Biodostupnost fenolnih spojeva iz emulzija ulje u vodenim ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae tijekom in vitro probave

---

**Đurđević, Mirna**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:044978>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Mirna Đurđević

1190/N

**BIODOSTUPNOST FENOLNIH  
SPOJEVA IZ EMULZIJA ULJE U  
VODENIM EKSTRAKTIMA  
BILJAKA PORODICE *Lamiaceae*  
TIJEKOM *in vitro* PROBAVE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Tamare Jurina, te uz pomoć doc. dr. sc. Maje Benković.

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Tamari Jurini na iskazanoj pomoći, savjetima i razumijevanju prilikom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Maji Benković, doc. dr. sc. Ani Jurinjak Tušek i doc. dr. sc. Davor Valinger na ukazanoj pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima, sestri, dečku i prijateljima što su me podržavali i uljepšali mi godine studiranja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski rad

### BIODOSTUPNOST FENOLNIH SPOJEVA IZ EMULZIJA ULJE U VODENIM EKSTRAKTIMA BILJAKA PORODICE *Lamiaceae* TIJEKOM *in vitro* PROBAVE

*Mirna Đurđević, 1190/N*

**Sažetak:** Biljke porodice *Lamiaceae* bogat su izvor polifenolnih spojeva zbog čega se koriste u tradicionalnoj medicini te se sve više istražuje njihov terapijski učinak za određene neurodegenerativne kao i kronične bolesti poput dijabetesa tip II i kardiovaskularnih bolesti s ciljem prevencije i liječenja spomenutih bolesti. Prolaskom kroz gastrointestinalni trakt, promjena pH vrijednosti te utjecaj enzima prisutnih u probavi drastično smanjuju biodostupnost polifenolnih spojeva prisutnih u biljkama. Moguće je povećati biodostupnost polifenolnih komponenti emulgiranjem vodenih ekstrakata biljaka. U ovom istraživanju pripremljene su emulzije ulje u vodenom ekstraktu biljaka porodice *Lamiaceae* uz dodatak emulgatora polietilen glikol (PEG1500, PEG6000, PEG20000). Provedena je *in vitro* probava uzoraka tekućih i emulgiranih biljnih ekstrakata te su im određena fizikalna (ukupne otopljene tvari, vodljivost) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost). Analizom antioksidacijske aktivnosti nakon završene *in vitro* probave postignut je veći stupanj očuvanja kod emulgiranih biljnih ekstrakata u odnosu na neemulgirane biljne ekstrakte.

**Ključne riječi:** *Lamiaceae*, emulzije ulje u vodenom ekstraktu biljke, polietilen glikol, *in vitro* probava, polifenoli

**Rad sadrži:** 57 stranica, 19 slika, 4 tablice, 45 literaturnih navoda, 00 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Tamara Jurina

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Maja Benković

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek
2. Doc. dr. sc. Tamara Jurina
3. Doc. dr. sc. Maja Benković
4. Doc.dr.sc. Antonija Trontel

**Datum obrane:** 30.09.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Process Engineering  
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

Graduate Thesis

### BIOAVAILABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM OIL-IN-WATER EMULSIONS FROM PLANTS BELONGING TO *Lamiaceae* FAMILY DURING *in vitro* DIGESTION

*Mirna Đurđević, 1190/N*

**Summary:** Plants belonging to *Lamiaceae* are rich source of polyphenolic compounds for which they are used in traditional medicine. Their therapeutic effect for treating specific neurodegenerative and chronic conditions such as diabetes mellitus type II and cardiovascular diseases is in focus of scientific research with the aim to prevent and treat the mentioned conditions. During the ingestion through gastrointestinal tract, the pH change and presence of the enzymes in gastrointestinal tract have drastic impact on bioavailability of polyphenolics present in plants. It is possible to increase the bioavailability of polyphenolics by emulsification of plant water extracts. In this research, oil-in-plant water emulsions were prepared from plant extracts of *Lamiaceae* with the addition of polyethylene glycol (PEG1500, PEG6000, PEG20000). *In vitro* digestion of plant extracts and emulsified plant extracts was carried out and samples were tested for their physical properties (total dissolved solids and conductivity) and chemical properties (total polyphenolic content, antioxidant activity). Analysis of antioxidant activity after *in vitro* digestion resulted in a higher degree of preservation in emulsified plant extracts compared to non-emulsified plant extracts.

**Keywords:** *Lamiaceae*, emulsion plant extracts, polyethylene glycol, *in vitro* digestion, polyphenols

**Thesis contains:** 57 pages, 19 figures, 4 tables, 45 references, 00 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD. *Tamara Jurina*, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD *Maja Benković*, Assistant professor

**Reviewers:**

1. PhD *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
2. PhD. *Tamara Jurina*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
4. PhD. *Antonija Trontel*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 30.09.2020

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1. USNAČE ( <i>Lamiaceae</i> )	2
2.1.1. Taksonomija porodice usnača	2
2.1.2. Terapijski učinci biljaka porodice <i>Lamiaceae</i>	4
2.2. VAŽNOST ANTIOKSIDANSA	6
2.2.1. Oksidacijski stres	6
2.2.2. Antioksidansi	7
2.2.3. Polifenoli	7
2.2.4. Ekstrakcija polifenola	8
2.3. EMULZIJE	9
2.3.1. Emulgatori	10
2.3.2. Polietilen glikol (PEG)	11
2.3.3. Mehanizam stvaranja emulzija	12
2.4. OSNOVE MEHANIZMA PROBAVNOG SUSTAVA	13
2.4.1. <i>In vitro</i> probava	13
2.4.2. Probava u ustima	13
2.4.3. Probava u želucu	13
2.4.4. Probava u tankom crijevu (duodenum)	14
2.4.5. Probava u debelom crijevu	14
2.4.6. Probava polifenola	15
2.4.7. Probava emulzija	15
2.4.8. Probava emulgiranih vodenih ekstrakata	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Uzorci	18
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Aparatura i pribor	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Priprema vodenih biljnih ekstrakata	20
3.2.2. Priprema emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljaka	20
3.2.3. <i>In vitro</i> simulacija probavnog sustava	21
3.2.4. Određivanje fizikalnih svojstava	22
3.2.4.1. Mjerenje ukupne otopljene tvari i vodljivosti	22
3.2.4.2. Mjerenje pH	22
3.2.4.3. Određivanje suhe tvari biljke standardnom metodom sušenja	22
3.2.5. Određivanje kemijskih svojstava	23
3.2.5.1. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom	23
3.2.5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	25
3.2.5.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>28</b>
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA I EMULZIJA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU BILJAKA PRIJE I NAKON <i>in vitro</i> SIMULACIJE PROBAVE	28
4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA I EMULZIJA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU BILJAKA NAKON <i>in vitro</i> SIMULACIJE PROBAVE	35
4.3. POSTOTAK PREŽIVLJAVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA S ANTIOKSIDACIJSKOM AKTIVNOŠĆU	49
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>53</b>



# 1. UVOD

Aromatične biljke koje pripadaju porodici usnača (*Lamiaceae*) uzgajaju se diljem svijeta zbog svoje široke primjenjivosti u tradicionalnoj medicini i kulinarstvu, kao i nezahtjevnom načinu uzgajanja te lijepom izgledu (Ramasubramania Raja, 2012). Esencijalna ulja, hidroksicimetne kiseline i flavonoidi koje nalazimo u biljkama poput origana, bosiljka, mente, kadulje, lavande, melise, majčine dušice ili ružmarina, kao reprezentativnih vrsta porodice *Lamiaceae*, imaju široki spektar biološki aktivnog djelovanja (Vladimir-Knežević i sur., 2014) od antimikrobnog, antioksidacijskog, antialergenog djelovanja, prevencije dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti kao i umirujući učinak koji pomaže kod glavobolja, iziritirane kože ili unutrašnjosti crijeva (Ramasubramania Raja, 2012). Istraživanja pokazuju da prehrana bogata polifenolima može spriječiti nastanak degenerativnih bolesti što otvara vrata funkcionalnoj hrani obogaćenoj polifenolima. Upravo su za takve proizvode zanimljive biljke iz porodice *Lamiaceae* zbog visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva. Današnje tržište bolje prihvaća prirodne izvore od sintetskih pa je i u tom pogledu zanimljivo proučavati ovu porodicu biljaka (Tzima i sur., 2018).

Stoga je cilj ovog rada bio pripremiti emulzije ulja u vodenom ekstraktu biljaka koje pripadaju porodici *Lamiaceae* (menta, melisa, majčina dušica, kadulja i lavanda) uz dodatak emulgatora polietilen glikol (PEG), različite molekulske mase (PEG1500, PEG6000, PEG20000). Kako bi se odredila i usporedila biodostupnost polifenola iz tekućih i emulgiranih biljnih ekstrakata, provedena je *in vitro* simulacija probavnog sustava. Rezultati dobiveni mjerenjem fizikalnih (ukupne otopljene tvari, vodljivost) i kemijskih svojstava (udio ukupnih polifenola, antioksidacijska aktivnost) tekućih i emulgiranih biljnih ekstrakata nakon završene *in vitro* probave su analizirani i kasnije uspoređeni kako bi se utvrdio oblik u kojem je najučinkovitije konzumirati ekstrakte navedenih biljaka, s ciljem očuvanja ljudskog zdravlja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. USNAČE (*Lamiaceae*)

#### 2.1.1. Taksonomija porodice usnača

Usnače (*Lamiaceae*), u prošlosti nazivane *Labiatae*, najbrojnija su porodica biljaka iz reda *Lamiales* (Anonymous 1). Porodica *Lamiaceae* sadrži oko 236 rodova od kojih je najveći *Salvia* (900), *Scutellaria* (360), *Stachys* (300), *Plectranthus* (300), *Hyptis* (280), *Teucrium* (250), *Vitex* (250), *Thymus* (220) i *Nepeta* (200) (Ramasubramania Raja, 2012.). Taksonomija porodice *Lamiaceae* prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Taksonomija porodice *Lamiaceae* (Wikipedia, 2020)

Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Lamiales</i>
Porodica	<i>Lamiaceae</i>

Usnače (slika 1) su većinom višegodišnje ili jednogodišnje zeljaste i grmolike biljke. Listovi su jednostavni i smješteni nasuprotno. Naziv usnače dobile su prema vjenčiću od pet latica koji je građen u obliku gornje i donje usne. Čaška je srasla od pet lapova te su cvjetovi biljke jednosimetrični. Prašnici su filamentima srasli za vjenčić te ih ima četiri, uz iznimku kadulje i ružmarina. Plod se naziva kalavac (Britannica, 2020).

Pripadnici ove porodice uzgajaju se širom svijeta što mogu zahvaliti aromatičnosti gotovo svih dijelova biljke. Zbog svoje aromatičnosti često se koriste u kulinarstvu (Ramasubramania Raja, 2012).



Slika 1. Kadulja (*Salvia officinalis*) – dijelovi biljke karakteristični za porodicu biljaka *Lamiaceae* (Wikipedia, 2020)

Svoju aromatičnost biljke porodice *Lamiaceae* duguju polifenolnim spojevima. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji samu biljku štite od vanjskih štetnih utjecaja kao što su primjerice UV zračenje, infekcije itd. Osim aromatičnosti zbog koje su često korištene u kulinarstvu, zbog visokog udjela polifenola imaju i važnu ulogu u ljudskom zdravlju jer polifenoli djeluju kao antioksidansi (Tzima i sur, 2018). Polifenoli prisutni u biljkama porodice *Lamiaceae* su: ružmarinska kiselina, protokatehinska, p-hidroksibenzojeva, gentinska kiselina, klorogenska kiselina, siringinska kiselina, kafeinska kiselina, vanilinska kiselina, p-kumarinska kiselina i ferulinska kiselina. Navedeni spojevi kod usnača nalaze se u različitim omjerima uz naglasak na ružmarinsku kiselinu koja se kod svih biljaka u svim dijelovima biljke nalazi u najvećoj količini (Zgorka i Glowniak, 2001).

Analizom kemijskog sastava ekstrakata biljaka koje pripadaju porodici *Lamiaceae* (majčina dušica, melisa/matičnjak, menta, oregano i kadulja) u istraživanju koje su proveli Mekinić i sur. (2014) pronađena su 24 fenolna spoja – jednostavni fenoli, fenolne kiseline, stilbeni, katehini, flavanol i flavoni. Prisutnost monomera hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline značajno je manja od količine ružmarinske kiseline prisutne u uzorcima. Ružmarinska kiselina je ester kafeinske kiseline i najčešći je spoj među biljkama porodice *Lamiaceae*. Rezultati ovog istraživanja podudaraju se sa rezultatima istraživanja koje su proveli Zgorka i Glowniak (2001) te Wojdylo i sur. (2007). Fenolni spojevi iz grupe flavonoida koji su prisutni u značajnim

količinama su kvercetin, kvercetin-4-glukozid i luteolin (Mekinić i sur., 2014; Wojdylo i sur. 2007).

### 2.1.2. Terapijski učinci biljaka porodice *Lamiaceae*

Pripadnice obitelji *Mentha* imaju široku primjenu u liječenju prehlade, bronhitisa, tuberkuloze, sinusitisa. Također su poznate po diuretičkim svojstvima, svojstvima ublažavanja nadutosti i pomoći kod iskašljavanja. Ekstrakti ovih biljaka pokazuju snažna antioksidacijska svojstva (Stagos i sur., 2012). Oksidacijski stres kao neravnoteža između kisikovih reaktivnih vrsta i staničnog kapaciteta za “gašenje” istih vodi prema oštećenju DNA, lipida, ugljikohidrata i proteina u stanici (Vladimir-Knežević i sur., 2014). Provedena su istraživanja koja istražuju utjecaj ekstrakata biljaka porodice *Lamiaceae* kao jednih od često korištenih biljaka u tradicionalnoj medicini, ali i kulinarstvu, koje su bogate sekundarnim metabolitima, na neurodegenerativne i kronične bolesti koje se smatraju posljedicom, između ostalog, oksidacijskog stresa. Rezultati istraživanja Stagos i sur. (2012) pokazuju da bi se ekstrakti biljaka porodice *Lamiaceae* mogli koristiti kao aditivi u prehrambenoj industriji ili kao dodaci prehrani u svrhu prevencije bolesti posredovanih oksidacijskim oštećenjima DNA.

Alzheimerova bolest koja se smatra najčešćim uzrokom demencije liječi se inhibicijom kolinesteraze, a smatra se posljedicom oksidativnog oštećenja živčanih stanica (Vladimir-Knežević, 2014). Istraživanjem koje su proveli Vladimir-Knežević i sur. (2014) određeni su pozitivni učinci ekstrakata 26 biljaka porodice *Lamiaceae* u koncentracijama 0,25, 0,50 i 1 mg mL<sup>-1</sup> na inhibiciju acetilkolinesteraze te su rezultati pokazali stopu inhibicije iznad 75 % za uzorke od 1 mg mL<sup>-1</sup> biljaka *Mentha x piperita*, *Mentha longifolia*, *Salvia officinalis*, *Satureja montana*, *Teucrium arduini*, *Teucrium chamaedrys*, *Teucrium montanum*, *Teucrium polium* i *Thymus vulgaris*.

Inhibicijom  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze, enzima koji su uključeni u metabolizam ugljikohidrata može se utjecati na smanjenje postprandijalnog porasta glukoze u krvi što može predstavljati jednu od strategija u upravljanju dijabetesom tip II. Biljni polifenoli smatraju se prirodnim inhibitorima ovih enzima (Kwon i sur., 2006). Biljna porodica *Lamiaceae* zbog svog bogatog polifenolnog sastava istraživan je i u svrhu određivanja inhibicijskog utjecaja na  $\alpha$ -glukozidazu i  $\alpha$ -amilazu. Vodeni ekstrakti origana imali su najviše vrijednosti ukupnih polifenola. U usporedbi s vodenim ekstraktima, ekstrakti u etanolu imali su 50 % manje vrijednosti ukupnih

polifenola (Kwon i sur., 2006). Kwon i sur. (2006) došli su do zaključka kako su profil polifenola i njihov sinergistički utjecaj važniji za antioksidacijsku aktivnost od njihovog ukupnog sastava. Na temelju tog istraživanja, također je zaključeno kako bi se biljke porodice *Lamiaceae* koje imaju visok sadržaj ružmarinske, kafeinske, protokatehinske kiseline i kvercetina mogle koristiti u upravljanju glikemijskog odgovora kod oboljelih od dijabetesa tip II.

Osim toga, dijabetes tip II povezan je sa rizikom od kardiovaskularnih bolesti. Inhibicija angiotensin I converting enzima (ACE) utječe na regulaciju krvnog tlaka te se istražuju biljke bogate polifenolima koji imaju inhibicijski utjecaj na ACE. Kwon i sur. (2006) zaključili su kako veći utjecaj na inhibiciju ACE imaju vodeni ekstrakti biljaka, posebice ružmarina (90,5 %), melise (81,9 %) i origana (37,4 %), u usporedbi sa ekstraktima u etanolu. Protektivni učinak polifenola iz biljnih ekstrakata na kardiovaskularne bolesti očituje se i u antitrombocitnom djelovanju flavonoida čime se sprječava stvaranje ugrušaka. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja flavonoida je stabilizacija membrane trombocita čime se smanjuje broj receptora na membrani stanice koji potiču agregaciju trombocita. Ekstrakti biljaka *Salvia officinalis* i *Salvia brachyodon* pri koncentracijama 21 nmol L<sup>-1</sup> pokazali su antitrombocitnu aktivnost (Bojić i sur., 2019). Također, pića obogaćena polifenolima (362 mg GAE L<sup>-1</sup>) smanjila su agregaciju trombocita kod zdravih sportaša nakon stresa (Thompson i sur., 2017), te je meta-analiza podataka objavljenih od 1966. godine do 2013. godine pokazala da je povećan unos flavanola za 20 mg na dan smanjilo rizik od srčanog udara za 14 % kod muškaraca, te je isti učinak potvrđen i kod žena.

Otpornost mikroorganizama koji su uzročnici brojnih bolesnih stanja organizma na antibiotike otvara mogućnosti istraživanjima novih mogućnosti u borbi protiv patogenih mikroorganizama. Biljke porodice *Lamiaceae* u tradicionalnoj medicini koriste se, između ostalog, zbog svojih antimikrobnih svojstava. Polifenoli su više učinkoviti u suzbijanju Gram-pozitivnih bakterija u usporedbi sa suzbijanjem Gram-negativnih bakterija što se pripisuje razlici u membranama tih bakterija i činjenici da se antimikrobna svojstva polifenola očituju uglavnom u narušavanju membranske strukture bakterije (Stagos i sur., 2012).

Varijabilnost u sadržaju polifenola i polifenolnom profilu ograničava uspjeh korištenja biljnih ekstrakata u terapijske svrhe. Varijabilnost je prisutna među biljkama iste porodice ali i među istim vrstama zbog načina uzgajanja, procesiranja i skladištenja (Kwon i sur., 2006). Iz tog razloga važno je odrediti koncentracije polifenola koje imaju terapijski učinak. Također, važno

je naglasiti da je topivost polifenola različita u različitim otapalima te je važno odabrati metodu ekstrakcije kojom se ekstrahiraju komponente koje imaju određeni terapijski učinak. Polarni polifenoli će se otapati u polarnim otapalima dok su nepolarni više topivi u ne-vodenim otapalima (Stagos i sur., 2012). Samo određivanje koncentracije polifenola nije dovoljno iz razloga što je biodostupnost npr. flavonoida ograničena na 24 % (Bojić i sur., 2019) te je potrebno provoditi istraživanja kako bi se utvrdila biodostupnost pojedinih spojeva kao i metode kojima bi se mogla povećati biodostupnost.

## 2.2. VAŽNOST ANTIOKSIDANSA

### 2.2.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je neravnoteža u odnosu oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa (Sies, 1991). Oksidacijski stres je posljedica povećanog učinka slobodnih radikala, ali i smanjenog kapaciteta rada zaštitnog antioksidacijskog sustava. Prisutnost slobodnih radikala u organizmu može biti posljedica staničnog disanja, tjelesne aktivnosti, mikrobnih infekcija ili djelovanja toksičnih tvari iz dima cigarete, alkohola, UV zračenja, pesticida itd. Slobodni radikali mogu predstavljati signalne molekule za proliferaciju stanica, apoptozu ili gensku ekspresiju (Pisoschi i Pop, 2015).

Molekule koje imaju svojstva slobodnih radikala dijele se na kisikove reaktivne spojeve (eng. Reactive Oxygen Species, ROS) kao što su: vodikov peroksid, superoksid, singletni kisik i hidroksilni radikal, reaktivne dušikove spojeve, željezo, bakar i molekule koje sadrže sumpor. Potvrđena je uloga slobodnih radikala tj. oksidacijskog stresa u patogenezi i patofiziologiji više od 100 bolesti kao uzrok ili kao posljedica bolesti među kojima su neurodegenerativne, kardiovaskularne, upalne bolesti te karcinomi. Osim toga, negativno utječu i na procese starenja (Pisoschi i Pop, 2015).

### 2.2.2. Antioksidansi

Prema definiciji, antioksidansi su sve vrste spojeva koje pri vrlo niskim koncentracijama značajno odgađaju ili inhibiraju oksidaciju supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1999). Endogene antioksidanse možemo podijeliti na enzimске i neenzimске. Enzimski antioksidansi koji su prisutni u svim eukariotskim stanicama su superoksid dismutaza, katalaze i glutathion peroksidaze (Sies, 1991). Neenzimski endogeni antioksidansi su glutathion, različiti proteini (ferritin, transferin, ceruloplasmin, albumin) i molekule niske molekularne mase kao mokraćna kislina, koenzim Q i lipoična kislina (Pisoschi i Pop, 2015). Egzogeni antioksidansi prisutni su u hrani biljnog podrijetla te se mogu unositi kao dodaci prehrani što ima dokazan pozitivan učinak na zdravlje ukoliko je prisutan oksidacijski stres iznad granice normalnog (Pisoschi i Pop, 2015). Antioksidanse se može podijeliti prema načinu djelovanja na antioksidanse prve linije obrane koji uključuju enzimске sustave (superoksid dismutazu, katalazu i glutathion peroksidazu) i antioksidanse druge linije obrane, molekule male molekulske mase podrijetlom iz hrane (tokoferoli, retinoli, polifenoli...) ili produkti metabolizma (mokraćna kislina, askorbat, reducirani glutathion). Također, može ih se podijeliti prema topivosti na topive u vodi (flavonoidi, askorbinska kislina, mokraćna kislina, glutathion) i topive u uljima (karotenoidi, tokoferoli) (Pisoschi i Pop, 2015).

### 2.2.3. Polifenoli

Polifenoli su grupa sekundarnih metabolita biljaka koji se dijele na flavonoide, fenolne kiseline, stilbene, tanine i lignane. Polifenoli kao skupina spojeva koja na aromatskom prstenu ima vezanu jednu ili više hidroksilnih grupa djeluju kao antioksidansi. Upravo razlika u broju i stupnju metilacije hidroksilnih skupina određuje antioksidacijsku aktivnost pojedinog spoja (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

S obzirom na strukturne karakteristike polifenola razlikujemo dvije veće podskupine: flavonoidi i fenolne kiseline.

Benzenski prsten sa 15 ugljikovih atoma (C6-C3-C6) i fenilpropanskom jedinicom čini strukturu svih flavonoida te se ova skupina polifenola smatra najraznolikijom u smislu biološke aktivnosti. Raznolikost flavonoida posljedica je strukturnih razlika na C-2 i C-3 pozicijama i karbonilne skupine vezane na C-4 atom. B prsten s kateholnom skupinom učinkovit je u

reakcijama s kisikovim i dušikovim slobodnim radikalima pri čemu nastaje stabilni fenoksil radikal. C prsten sa 4-okso skupinom i dvostrukom vezom između C-2 i C-3 odgovoran je za premještanje elektrona iz B prstena, dok flavonoidi sa A i C prstenima sa 4-okso skupinama i hidroksilnim skupinama blizu C3 i C5 imaju maksimalnu antioksidativnu aktivnost. Reakcije poput glikolizacije na C-3 ili prisutnost metoksi grupe na istoj toj poziciji također mijenjaju antioksidacijsku aktivnost (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

Fenolne kiseline odnosno derivati cimetine (npr. kafeinska i ferulinska kiselina) i benzoične (npr. vanilinska i galna kiselina) kiseline sastoje se od benzenskog prstena na koji su vezane hidroksilne i karboksilne grupe. Biološku raznolikost duguju različitom broju i načinu vezanja hidroksilnih i karboksilnih grupa te steričkim razlikama. Doniranjem vodika iz hidroksilne skupine "gase" aktivnost slobodnog radikala a sami postaju fenoksilni radikal koji je relativno stabilan zbog rezonancije. Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina raste porastom broja grupa vezanih na prsten, pa je tako galna kiselina najaktivnija benzoična kiselina koja sadrži hidroksilne skupine na C3, C4 i C5 atomima (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

#### 2.2.4. Ekstrakcija polifenola

Ekstrakcija podrazumijeva proces razdvajanja fitokemikalije tj. topivog dijela biljke od biljnog matriksa tj. netopivog dijela biljke (WHO, 2017). Polifenoli se mogu ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili sušenih uzoraka biljaka. Zbog svoje fenolne strukture polifenoli su više hidrofilni nego lipofilni te se dobro ekstrahiraju otapalima poput metanola, etanola, acetonitrila i acetona i njihovim mješavinama s vodom (Brglez Mojzer i sur., 2016). Najvažniji čimbenik koji određuje otapalo za ekstrakciju je polarnost spojeva koji se žele ekstrahirati. Osim polarnosti spojeva važno je uzeti u obzir temperaturu ekstrakcije, korake ekstrakcije, vrijeme trajanja ekstrakcije, omjer otapala i uzorka i broj ponavljanja ekstrakcije pojedinog uzorka (Tzima i sur., 2018; Brglez Mojzer i sur., 2016).

Metoda za ekstrakciju trebala bi biti brza, isplativa, ekološki prihvatljiva, reproducibilna i visokog prinosa (WHO 2017). Konvencionalne metode ekstrakcije poput maceracije, infuzije, refluksa i Soxhlet ekstrakcije temeljene su na difuziji otapala u biljni matriks pri čemu dolazi do otapanja fitokemikalija te otapalo obogaćeno fitokemikalijama difundira iz stanica biljke (Ngo i sur., 2018). Prednosti ovih metoda su jednostavnost, učinkovitost i široka uporabljivost zbog čega se upravo ove metode najčešće koriste.



Pri korištenju organskih otapala poput metanola, etanola, acetona, dietil etera i etil acetata u određenom omjeru s vodom moguće je da se u krajnjem proizvodu nađu ostaci otapala koji mogu biti opasni za zdravlje čovjeka zbog čega je potrebno provesti dodatno pročišćavanje. Istraživanja pokazuju da je etanol pogodnije otapalo za ekstrakciju spojeva niže molarne mase dok je vodena otopina acetona najpogodnija za spojeve veće molarne mase poput flavanola (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Temperatura pri kojoj je poželjno provoditi ekstrakciju je između 20 °C i 50 °C te se ne preporuča ekstrakcija pri temperaturi iznad 70 °C zbog moguće razgradnje antocijanina. Duže vrijeme ekstrakcije zahtijeva veliku količinu otapala što se smatra još jednim nedostatkom konvencionalnih (klasičnih) metoda ekstrakcije (Berglez Mojzer i sur., 2016). Upravo zbog navedenih nedostataka konvencionalnih metoda u znanstvenim istraživanjima povećan je interes za modernim metodama ekstrakcije. Moderne metode poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, superkritičnim fluidima, ekstrakcije potpomognute ultrazvučnim valovima i ubrzane ekstrakcije otapalom sve se češće koriste zbog kraćeg vremena trajanja ekstrakcije, niže cijene, održivosti i mogućnosti automatizacije procesa.

### 2.3. EMULZIJE

Zbog razlika u strukturi, molarnoj masi, polarnosti i agregatnom stanju, biološki aktivni spojevi dodaju se u nosače bioaktivnih tvari koji mogu spriječiti i/ili povećati biodostupnost dodanih biološki aktivnih spojeva. Nosači bioaktivnih tvari moraju zadovoljavati uloge zaštite funkcionalnog sastojka od biološke ili kemijske razgradnje, kontrole otpuštanja u ciljane organe tj. stanice u organizmu i kompatibilnost sa funkcionalnim dodatkom. Primjeri nosača bioaktivnih tvari su jednostavne otopine, emulzije i mikrokapsule (El i Simsek, 2012).

Emulzije su disperzni sustavi dviju nemješivih faza u obliku kapljica čiji je promjer 0,1 – 100 µm. Emulzije mogu biti ulje u vodi ili voda u ulju, takav naziv označava da je prva spomenuta faza dispergirana u drugoj, kontinuiranoj fazi. Emulzije su termodinamički nestabilni sustavi te se među fazama nalazi međufazni sloj koji može sadržavati površinski aktivne tvari – emulgatore. Emulgatori su prema strukturi amfipatske molekule tj sadrže hidrofobni i hidrofilni dio što ih čini pogodnim za međufazni sloj emulzija gdje djeluju tako da povećavaju kinetičku stabilnost (Singh i sur., 2009). Takva struktura koja sadrži nepolarni dio, polarni dio i amfipatski dio omogućuje da se u sustav “pakiraju” polarni, nepolarni i amfipatski spojevi što

predstavlja prednost kada govorimo o emulzijama kao nosačima bioaktivnih tvari (McClements i sur., 2007).

Emulzije prema strukturi dijelimo na:

- makroemulzije ulja u vodi (U/V) i vode u ulju (V/U) sa rasponom veličine čestica od 0,1  $\mu\text{m}$  do 5  $\mu\text{m}$ ,
- nanoemulzije sa rasponom veličine čestica 20 nm – 200 nm,
- višefazne emulzije tj. “emulzije u emulzijama” koje se pripremaju višestupanjskim procesima poput sustava voda/ulje/voda (V/U/V) i ulje/voda/ulje (U/V/U),
- miješane emulzije tj. sustavi koji sadrže dvije različite disperzne faze koje se ne miješaju u kontinuiranoj fazi i
- micelarne emulzije ili mikroemulzije sa rasponom veličine čestica od 5 nm – 50 nm (Tadros, 2016).

Nestabilnost emulzija se očituje u fizikalnim procesima stvaranja kremoznog sloja, flokulacije i koalescencije i kemijskim procesima lipidne oksidacije i hidrolize ili promjeni sastava međufaznog sloja (Singh i sur., 2009). Stvaranje kremoznog sloja može se umanjiti smanjenjem veličine kapljica emulzije, povećanjem viskoznosti kontinuirane faze ili smanjenjem razlike u gustoći između dvije faze. Flokulacija nastaje kada se dvije kapljice emulzije spoje kao rezultat neravnoteže privlačnih i odbojnih sila. Koalescencija je povećanje veličine kapljica emulzije što posljedično dovodi do razdvajanja faza (Singh i sur., 2008). Konvencionalne ulje u vodi emulzije sastoje se od kapljica ulja obavijenih tankim slojem emulgatora i dispergiranih u vodenoj, kontinuiranoj fazi (McClements i sur., 2007).

### 2.3.1. Emulgatori

Emulgatori su spojevi koji smanjuju međupovršinsku napetost između dviju faza, smanjuju energiju potrebnu za prevladavanje površinske napetosti te djeluju na stabilnost disperzije sprječavanjem flokulacije, koalescencije i razdvajanja dviju nemješljivih faza. Sposobnost spojeva da djeluju kao emulgatori klasificira se uz pomoć HLB (eng. Hydrophile-lipophile balance) broja. HLB broj označava omjer hidrofilnih i lipofilnih grupa u molekuli te se vrijednosti HLB kreću od 0 do 20. Spojevi sa vrijednostima HLB između 3 i 6 koriste se za emulzije voda u ulju, dok se spojevi sa HLB vrijednostima između 8 i 16 koriste za emulzije

ulje u vodi. Osim prema HBL vrijednostima, emulgatore dijelimo i prema ionskom karakteru na anionske, kationske, amfoterne i neiogene (Kralova i Sjoblom, 2009; Lovrić, 2003).

Emulgatori koji se koriste u prehrambenoj industriji, osim prema HBL vrijednostima i ionskom karakteru mogu se podijeliti na visokomolekularne (masni alkoholi, masne kiseline i glikolipidi) i niskomolekularne (prirodni polisaharidi i proteini) emulgatore (Kralova i Sjoblom, 2009). Niskomolekularni emulgatori su monogliceridi, lecitini i lizolecitini (fosfatidil kolin, fosfatidil serin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil inositol, fosfatidilna kiselina), glikolipidi i saponini (digalaktozil-digliceridi iz zob, pšenice i soje), masni alkoholi (alkohol etoksilat i alkilpoliglukozidi nastali polimerizacijom). Visokomolekularni emulgatori su proteini (kazein i proteini sirutke) i polisaharidi (guma arabika, pektin, galaktomanani) (Ozturk i McClements, 2016; Kralova i Sjoblom, 2009).

Emulgatori (surfaktanti, fosfolipidi, proteini ili polisaharidi) su prisutni u sloju debljine 1-10 nm. Svojstva emulzija mogu se odrediti koncentracijom i veličinom dispergiranih čestica kao i odabirom emulgatora. Također, moguće je odrediti naboj kapljica, pozitivan, neutralan ili negativan, odabirom emulgatora (McClements i sur., 2007). Homogenizacija uljne faze u vodenoj uz prisutnost emulgatora otopljenog u vodenoj fazi moguća je korištenjem visokosmičnih mješalica, homogenizatora visokog tlaka, koloidnih mlinova, ultrazvučnih homogenizatora i membranskih homogenizatora (McClements 2005; Walstra 2003, 1993). Odabir načina homogenizacije ovisi o svojstvima komponenata koje se homogeniziraju i željenim svojstvima emulzije (koncentracija kapljica, veličina kapljica, viskoznost) (McClements i sur., 2007).

Kako bi se sačuvao integritet polifenola iz vodenih biljnih ekstrakata i povećala njihova biodostupnost korištena je metoda lipidne inkapsulacije uz pomoć suncokretovog ulja i emulgatora PEG1500, PEG6000 i PEG20000.

### 2.3.2. Polietilen glikol (PEG)

Polietilen glikol (PEG) pri sobnoj temperaturi je bezbojna, viskozna tekućina topiva u vodi kada je molekulska masa spoja manja od 800, dok su spojevi polietilen glikola čija je molekulska masa veća od 800 bijele krutine, također topive u vodi. Polietilen glikol je nehlapivi spoj čije karakteristike pogoduju primjeni u farmaceutskoj industriji kao i u prehrambenoj.

Polietilen glikol ima GRAS status (eng. Generally Recognized as Safe) tj. Američka agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) ga je označila kao sigurnog za upotrebu (Chen i sur., 2004).

Pogodnost za primjenu u industriji je svakako i njegova slaba zapaljivost i biorazgradnja. Stabilan je pri svim uvjetima pH, visokim temperaturama i oksidacijskim sustavima. Polietilen glikol je spoj prisutan na tržištu u različitim oblicima koji se razlikuju prema molekularnoj masi. Broj u nazivu označava približnu molekularnu masu spoja, a na tržištu ih nalazimo od 200 do nekoliko desetaka tisuća. Polarnost vodenih otopina polietilen glikola veća je od čiste vode zbog čega je povećana i topljivost organskih molekula (Chen i sur., 2004).

Vežanjem izrazito lipofilnih molekula kao npr.  $\alpha$ -tokoferol, tokotrienoli,  $\beta$ -sitosterol ili kolesterol za polietilen glikol stvaraju se amfipatske molekule topive u vodi, netoksične i izrazito stabilne (Kralova i Sjoblom, 2009).

### 2.3.3. Mehanizam stvaranja emulzija

Proces stvaranja emulzija zahtijeva utrošak energije. Makroemulzije lakše je pripremiti u usporedbi sa nanoemulzijama za čiju je pripremu potrebna veća količina emulgatora i energije (Tadros, 2016). Rad potreban za stvaranje emulzije proporcionalan je međufaznoj napetosti i povećanju površine kapljica:

$$w = \sigma \cdot dA \quad (1)$$

gdje je  $w$  (J) – rad,  $\sigma$  ( $\text{J m}^{-2}$ ) – površinska napetost, a  $dA$  ( $\text{m}^2$ ) – povećanje površine disperzne faze.

Dodatkom emulgatora smanjuje se površinska napetost, a samim time i rad potreban za stvaranje emulzije. Tvorba emulzije ostvaruje se mehaničkim radom tj. miješanjem i smicanjem i/ili fizikalno-kemijski dodatkom emulgatora (Lovrić, 2003).

Osim o površinskim silama, stabilnost emulzije ovisi o veličini udjela disperzne faze, viskoznim svojstvima kontinuirane faze i o razlici gustoća između dvije faze. Ovisnost ovih veličina data je formulom:

$$\eta = \frac{\eta_0}{1-(h\Phi)^{\frac{1}{2}}} \quad (2)$$

gdje je  $\eta$  (Pa s) – viskoznost emulzije,  $\eta_0$  (Pa s) – viskoznost kontinuirane faze,  $\Phi$  (%) – volumni udio disperzne faze,  $h$  – hidratacijska konstanta (Lovrić, 2003).

## 2.4. OSNOVE MEHANIZMA PROBAVNOG SUSTAVA

### 2.4.1. *In vitro* probava

Probavu možemo opisati kao složeni sustav koji započinje u ustima i završava anusom. U probavu su uključeni jetra, žučni mjehur, žlijezde slinovnice i gušterača. Prilikom probave dolazi do razgradnje proteina na aminokiseline, masti na masne kiseline i glicerol dok se ugljikohidrati razgrađuju na jednostavne šećere. Molekule poput polifenola tijekom probave se transformiraju u druge molekule. Sustavi *in vitro* probave koriste se kako bi se odredile promjene u strukturi i sastavu hrane tj. određenih sastavnica prehrane te kako bi se omogućio jednostavniji i jeftiniji način za razumijevanje procesa probave i bioiskoristivosti komponenata hrane (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

### 2.4.2. Probava u ustima

U ustima dolazi do kemijskih, biokemijskih i mehaničkih promjena koje su posljedica promjene temperature, pH, a samim time i ionske jakosti, razgradnje enzimima prisutnim u slini te žvakanjem. Simulacija uvjeta u ustima preporuča se za uzorke bogate ugljikohidratima te za uzorke čija je veličina čestica između 50–1000  $\mu\text{m}$ . *In vitro* probava u ustima najčešće uključuje dodatak  $\alpha$ -amilaze pri pH 7 (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

### 2.4.3. Probava u želucu

Probava u želucu uključuje peristaltiku koja usitnjava hranu na čestice veličine 1 do 2 mm, te aktivnost probavnih sokova prisutnih u želucu. Želučani sok je smjesa pepsinogena, lipaza, mukusa, elektrolita, klorovodične kiseline i vode. Prije dolaska hrane u želudac pH želuca je

1,3 do 2,5. Dolaskom hrane pH vrijednost želuca se povećava iznad pH = 4,5 ovisno o puferskom kapacitetu unešene hrane.

#### 2.4.4. Probava u tankom crijevu (duodenum)

U tankom crijevu pH vrijednosti variraju između 5,4 i 7,5 u duodenumu; u jejunumu se kreću u rasponu od 5,3 do 8,1 dok su u ileumu u rasponu od 7,0 do 7,5. Osim pH u obzir se uzimaju temperatura, vrijeme probave i djelovanje elektrolita, enzima (pankreasne proteaze, amilaze i lipaze zajedno s maltazom, laktazom,  $\alpha$ -dekstrinazom i peptidazama) i žučnih soli. Razina kisika, prisutnost  $\alpha$ -glukozidaze, dovoljna koncentracija žučnih soli, lipaze, amilaze i proteaze su čimbenici koji utječu na apsorpciju fitokemikalija. Neprobavljeni trigliceridi vezanjem fitokemikalija mogu onemogućiti apsorpciju lipofilnih fitokemikalija dok proteini i polisaharidi koji nisu probavljeni mogu vezati fitokemikalije topive u vodi te na taj način utjecati na njihovu biodostupnost. Razlike u enzimima koji se koriste čine razliku među istraživanjima što predstavlja problem pri uspoređivanju rezultata različitih istraživanja (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

#### 2.4.5. Probava u debelom crijevu

Veliki katalitički i hidrolitički potencijal debelog crijeva leži u približno  $10^{12}$  mikroorganizama na  $\text{cm}^3$  površine debelog crijeva. Enzimi crijevne mikroflore zaslužni su za katalizu brojnih reakcija hidrolize, dehidroksilacije, demetilacije, cijepanja prstenova, dekarboksilacije i dekonjugacije (Spencer, 2003). Za razliku od humanih enzima, katalitička sposobnost enzima crijevne mikroflore ima potencijal da razgradi spojeve poput fenolnih kiselina. Takav učinak dokazan je istraživanjima koja su analizirala specifične metabolite u urinu čija je povećana koncentracija povezana sa povećanom konzumacijom hrane bogate polifenolnim spojevima (Spencer, 2003).

#### 2.4.6. Probava polifenola

Polifenoli u hrani uglavnom se nalaze u obliku estera, glikozida i polimera što određuje njihovu probavljivost u gastrointestinalnom traktu te se apsorbiraju procesom difuzije pri čemu prolazak kroz lipidni dvosloj stanica ovisi o njihovoj polarnosti te se polarniji polifenoli bolje apsorbiraju. Najbolje se apsorbiraju izoflavoni, a slijede ih galna kiselina, katehini, flavanoni i glikozidi kvercetina. S druge strane, proantocijanidi, katehini porijeklom iz čaja na koje je vezana galna kiselina i antocijani se najslabije apsorbiraju (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Iako je vrijeme probave u ustima kratko, do važnih interakcija dolazi kada polifenolni spojevi reagiraju sa komponentama koje su prisutne u slini (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020). Istraživanje poput onog koje su proveli Ginsburg i sur. (2012) ukazuje kako slina ima važnu ulogu u povećanju topivosti polifenola porijeklom iz biljnih sokova a samim time i njihovu dostupnost. U ustima je također prisutna i  $\beta$ -glukozidaza koja ovisno o tipu šećera prisutnog u glikozidima može dovesti do hidrolize (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020). Polifenoli imaju tendenciju vezanja za proteine iz sline, hidrofobnost povećava jakost veze polifenol-protein (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020). U želucu dolazi do apsorpcije manje količine polifenolnih spojeva (Jurinjak-Tušek i sur., 2017). Djelovanjem enzima koji su prisutni u želucu i niskog pH dolazi do razgradnje polifenola na manje jedinice. Uvjeti visokog pH u duodenumu dovode do metilacije, deglikolizacije, glukuronizacije, vezanja sulfatne skupine, hidroksilacije polifenola što može dovesti do povećanja antioksidacijske aktivnosti. Slobodne polifenolne kiseline mogu se apsorbirati u želucu dok se esterificirane polifenolne kiseline razgrađuju uz pomoć crijevne mikroflore (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

#### 2.4.7. Probava emulzija

Tijekom probave emulzije su izložene različitim uvjetima te su struktura, gustoća, sastav i naboj međufaznog sloja važni čimbenici koji određuju sudbinu emulzije tijekom procesa probave (Singh i sur., 2009).

Probava u ustima mijenja temperaturu emulzije na tjelesnu temperaturu te pH čime se mijenja ionska jakost. Unatoč kratkom vremenu izlaganja slini i probavnim enzimima u ustima, ipak dolazi do određenih promjena koje utječu na stabilnost emulzije. Slina i mucin utječu na pojavu flokulacije. Do flokulacije dolazi kada visokomolekularni polimer pri izrazito niskim koncentracijama adsorbira dvije ili više kapljica emulzije formirajući mostove. Flokulacija je

također posljedica prisutnosti biopolimera koji nema sposobnost adsorpcije u kontinuiranoj fazi emulzije, a koji potiče povezivanje kapljica emulzije stvaranjem gradijenta osmotskog tlaka u kontinuiranoj fazi. Osim mucina koji je zaslužan za flokulaciju kapljica emulzije, koji se prema *in vitro* istraživanjima u slini nalazi u preniskim koncentracijama da bi izazvao flokulaciju, čini se da drugi spojevi prisutni u ljudskoj slini utječu na flokulaciju emulzija, kao npr. glikoproteini bogati prolinom koji reagiraju s različitim molekulama, osobito polifenolima (Singh i sur., 2009).

Dolaskom u želudac dolazi do značajne promjene pH vrijednosti koje se kreću u rasponu od 1 do 3), mehaničkog miješanja zbog peristaltike želuca i interakcija s probavnim sokovima u želucu. U želucu dolazi do strukturnih promjena koje su posljedica procesa flokulacije i koalescencije kapljica emulzije i modifikacije međufaznih slojeva (Singh i sur., 2009).

Novi uvjeti s kojima se susreću emulzije su uvjeti u duodenumu gdje je pH ponovno viši od onog u želucu što za posljedicu ima i promjenu ionske jakosti. U duodenumu dolazi do interakcija sa žučnim solima i pankreasnim sekretom. Žučne soli odvajaju emulgator od kapljica emulzije čime se potiče vezanje lipaze na uljne komponente emulzije (Singh i sur., 2009). Pretpostavlja se da napredovanje lipolize ovisi o emulgatoru, tj. o gustoći međufaznog sloja i prisutnosti drugih komponenata. Istraživanje koje su proveli Mun i sur. (2007) pokazalo je da se proteini sirutke kao emulgatori lakše uklanjaju iz međufaznog sloja od kazeinata.

Zbog veće specifične površine, emulzije s kapljicama manjeg promjera brže se hidroliziraju od emulzija koje se sastoje od kapljica većeg promjera. Takve razlike u emulzijama određuju stupanj hidrolize koji je u želucu u rasponu od 5 do 37 % te 30-75 % u duodenumu zdravih ljudi (Singh i sur., 2009). U spomenutom istraživanju koje su proveli Mun i sur. (2007) navedeno je da stabilnost emulzija ovisi o tipu emulgatora pri čemu je izolat proteina sirutke najmanje stabilan, a emulzije pripravljene s emulgatorom Tween 20 najstabilnije.

#### 2.4.8. Probava emulgiranih vodenih ekstrakata

Kako bi se spriječio utjecaj okolišnih uvjeta (npr. svjetlo, temperatura ili kisik) na stabilnost polifenola i njihovu bioaktivnost predložena je inkapsulacija polifenola u nanočestice emulzija kako bi se povećala njihova biodostupnost. Prednosti inkapsuliranih polifenola u nanočestice



su njihova biorazgradivost, niska toksičnost i mogućnost modificiranja otpuštanja inkapsuliranih spojeva (Pimentel-Moral i sur., 2018).

Polifenoli kao izrazito reaktivne molekule prolaskom kroz gastrointestinalni trakt dolaze u interakcije s drugim komponentama hrane pa tako i sa lipidima tj. produktima lipidne peroksidacije. Pri interakciji sa produktima lipidne peroksidacije dolazi do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva, međutim ukoliko su inkapsulirani unutar nanočestica emulzije do takvih interakcija ne dolazi čime se sprječava smanjenje antioksidacijske aktivnosti (Pimentel-Moral i sur., 2018). Velika raznolikost polifenolnih spojeva i njihove reaktivnosti izazovi su pri odabiru uljne faze i emulgatora koji bi povećali učinkovitost inkapsulacije i biodostupnost polifenola u gastrointestinalnom sustavu. Svi spojevi prisutni u emulziji mogu utjecati na svojstva emulzije tj. na međufazne površine te veličinu i oblik čestica. Prisutnost visoke koncentracije emulgatora koji ima ulogu povećati stabilnost emulzije može kompromitirati topivost spojeva što je negativna strana ove metode (Pimentel-Moral i sur., 2018). Unatoč tome, postoje istraživanja koja potvrđuju uspješnost ove metode. Polifenoli iz crnog i zelenog čaja u emulziji s maslinovim uljem, fosfatidilkolinom i žučnim solima povećali su veličinu kapljica emulzije i smanjili specifičnu površinu interakcije fosfatidilkolina na kapljicama emulzije (Shishikura i sur., 2006).

Brza probava i brže otpuštanje inkapsuliranih spojeva pripisuje se karakteristikama kapljica emulzije. Karakteristike kapljica emulzije koje tome doprinose su mala veličina kapljica i posljedično velika površina. Takve kapljice mogu se apsorbirati putem limfnih žila, mukoznim slojem stanica u crijevima ili endocitozom što povećava terapijski učinak inkapsuliranih spojeva (Pimentel-Moral i sur., 2018).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci

Za pripravu vodenih ekstrakata korišteni su list kadulje (*Salvia officinalis* L.), cvijet lavande (*Lavandula angustifolia*), zelen majčine dušice (*Thymus serpyllum*), list melise (*Melissa officinalis*) i list mente (*Mentha x piperita*) proizvođača Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska), berba 2020. godine. Zemlja podrijetla kadulje i majčine dušice je Hrvatska, lavande Kina dok je zemlja podrijetla za mentu i melisu Srbija.

##### 3.1.2. Kemikalije

U eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Destilirana voda
- Suncokretovo ulje, Zvijezda, Zagreb, Hrvatska
- $\alpha$ -amilaza, Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države
- Dinatrijev hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) p.a., Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ )) p.a., Sigma-Aldrich, Njemačka
- Folin-Ciocalteu reagens p.a., Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Galna kiselina ( $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$ ) p.a., ACROS ORGANICS, Kina
- Kalcijev klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) p.a., GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina (HCl) 37 %, CARLO ERBA Reagents S.A.S, Francuska
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) p.a., J.T. Baker, Nizozemska
- Natrijev acetat-trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) p.a., J.T. Baker, Nizozemska
- Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) p.a., Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogen karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) p.a., Franck, Zagreb, Hrvatska
- natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) p.a., GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl) p.a., Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države
- Koncentrirana octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) p.a., T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska

- Pankreatin, Sigma-Sldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države
- Pepsin, Fisher Scientific UK, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo
- PEG (polietilen glikol) 1500 Acros Organics, Njemačka
- PEG (polietilen glikol) 6000 Acros Organics Belgija
- PEG (polietilen glikol) 20000 SigmaAldrich, Njemačka
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) p.a., Sigma-Aldrich Co., Rusija
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ, (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)) p.a., Sigma-Aldrich, Švicarska
- Željezov(III) klorid heksahidrat (FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O) p.a., GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Željezov(III) sulfat heptahidrat (FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O) p.a., Sigma-Aldrich, Njemačka
- Žučne soli, Sigma-Aldrich, Auckland, Novi Zeland

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- eksikator (Normax, Portugal)
- konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- magnetska mješalica (Heidolph Instruments, Njemačka)
- OMNI TH220-PCRH homogenizator (Omni international, SAD)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- spektrofotometar (Biochrom Libra S12, Engleska)
- termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- uljna-vodena kupelj s integriranom mješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Latvija)

Pribor:

- aluminijske posudice
- Celulozni filter papir, veličina pora 5-13  $\mu\text{m}$  (LLG Labware Meckenheim, Njemačka)
- kiveta od kvarcnog stakla
- menzure volumena 100 mL i 200 mL
- metalna špatula za vaganje
- mikropipete volumena 10 - 100  $\mu\text{L}$ , 100 -1000  $\mu\text{L}$ , 0,5 – 5 mL i 1 – 10 mL
- plastične kivete
- staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 250 mL
- staklene epruvete
- stakleni ljevci

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema vodenih biljnih ekstrakata

U staklenu čašu volumena 200 mL odvažuje se 2 g usitnjenog osušenog bilja te se prelije sa 100 mL destilirane vode, prethodno zagrijane na temperaturu 80 °C u uljnoj kupelji (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk Staufen, Njemačka) pri brzini miješanja 250 rpm tijekom 30 minuta. Nakon isteka vremena ekstrakcije uzorak se filtrira kroz celulozni filter papir veličine pora 5-13  $\mu\text{m}$  (LLG Labware Meckenheim, Njemačka) kako bi se odvojila tekuća faza od krute faze. Tako pripremljenim ekstraktima određena su fizikalna svojstva (ukupne otopljene tvari, vodljivost i pH) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodama).

### 3.2.2. Priprema emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljaka

Emulzije ulje u vodenom ekstraktu biljaka pripremaju se miješanjem suncokretovog ulja i vodenih biljnih ekstrakata uz dodatak emulgatora polietilen glikol (PEG1500, PEG6000 i PEG20000) pri prethodno određenim optimalnim uvjetima (udio uljne faze u emulziji, koncentracija emulgatora, brzina miješanja, vrijeme miješanja). Optimalni uvjeti za PEG1500

iznosili su: 34,99 % udio uljne faze u emulziji, 2,10 % koncentracija emulgatora, brzina miješanja od 15250 rpm i vrijeme miješanja od 4 min. Optimalni uvjeti za PEG6000 iznosili su: 35 % udio uljne faze u emulziji, 3,52 % koncentracija emulgatora, brzina miješanja od 15000 rpm i vrijeme miješanja od 4 min. Optimalni uvjeti za PEG20000 iznosili su: 25,98 % udio uljne faze u emulziji, 2,04 % koncentracija emulgatora, brzina miješanja od 15900 rpm i vrijeme miješanja od 4 min. Rezultati pokusa optimiranja emulgiranja nisu prikazani u ovom diplomskom radu, već su preuzeti iz rada Ivanković (2020). U falcon epruvete volumena 15 mL otpipetira se odgovarajući volumen biljnog ekstrakta u kojem je prethodno otopljena odgovarajuća masa emulgatora polietilen glikola te se otpipetira odgovarajući volumen suncokretovog ulja. Pripremljena smjesa homogenizira se tijekom 4 minute. Tako pripremljenim emulzijama određena su fizikalna svojstva (ukupne otopljene tvari, vodljivost i pH) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodama)

### 3.2.3. *In vitro* simulacija probavnog sustava

*In vitro* simulacija probavnog sustava provedena je prema metodi opisanoj u radu autora Ortega i sur. (2011) te započinje korakom koji simulira uvjete u ustima. Izvaže se 40 mg  $\alpha$ -amilaze i otopi u 40 mL fosfatnog pufera s dodatkom 0,04 % w/w NaCl i 0,004 % CaCl<sub>2</sub>. Smjesa enzima, pufera i soli stavi se u uljnu kupelj i zagrije na temperaturu 37 °C te se pri postignutoj temperaturi doda 4 mL biljnog uzorka odn. pripremljene emulzije ulje u vodenom ekstraktu biljke. Inkubacija traje 5 minuta. Nakon 5 minuta izuzeto je 1 mL uzorka iz reakcijske smjese. Zatim je uslijedilo podešavanje pH reakcijske smjese na pH = 2 postepenim dodavanjem klorovodične kiseline (37 %), čime se simuliraju uvjeti probave u želucu. Nakon podešavanja pH vrijednosti dodaje se suspenzija pepsina (60 mg pepsina otopljenog u 4 mL 0,01 mol L<sup>-1</sup> HCl) te se reakcijska smjesa inkubira 2 sata pri 37 °C. Nakon dva sata izuzeto je 1 mL uzorka iz reakcijske smjese. Treći korak *in vitro* simulacije probavnog sustava započinje podešavanjem pH reakcijske smjese na pH = 6,5 dodatkom NaHCO<sub>3</sub> što odgovara uvjetima u tankom crijevu (duodenum). Nakon podešavanja pH vrijednosti dodaje se suspenzija pankreatina (0,08 g pankreatina otopljenog u 10 mL fosfatnog pufera) i žučnih soli (0,5 g žučnih soli otopljenih u 10 mL fosfatnog pufera) te se reakcijska smjesa inkubira 2 sata pri 37 °C. Nakon 2 sata izuzeto je 1 mL uzorka iz reakcijske smjese. Nakon svakog provedenog koraka *in vitro* simulacije probave, uzorci su profiltrirani te su odmah stavljeni na hlađenje

(smjesa leda i vode) te su im određena fizikalna (ukupne otopljene tvari, vodljivost) i kemijska (ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodama) svojstva.

### 3.2.4. Određivanje fizikalnih svojstava

#### 3.2.4.1. Mjerenje ukupne otopljene tvari i vodljivosti

Za mjerenje vodljivosti i udjela ukupnih otopljenih tvari korišten je konduktometar (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska) sa sondom koja se uroni u uzorak (biljni ekstrakt odn. emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljke) pri čemu se očitaju vrijednosti vodljivosti ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) i ukupne otopljene tvari ( $\text{g L}^{-1}$ ). Uzorci su prije svakog mjerenja homogenizirani na vorteksu (BiosanVortex V1 Plus, Latvija).

#### 3.2.4.2. Mjerenje pH

U ovom radu izmjerene su pH vrijednosti biljnih ekstrakata odnosno emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljaka prije samog procesa *in vitro* probave pomoću pH metra (Jenco 601A, SAD) koji je prethodno kalibriran koristeći standard s vrijednostima  $\text{pH} = 4$  i  $\text{pH} = 7$ .

#### 3.2.4.3. Određivanje suhe tvari biljke standardnom metodom sušenja

Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja na  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  do konstantne mase (AOAC, 1995). U suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem, prethodno izvaganu s točnošću  $m = \pm 0,0002\text{ g}$  odvaže se određena količina uzorka (biljnog materijala) ( $m = 1\text{-}5\text{ g} \pm 0,0001$ ). Posudica se suši u sušioniku sa skinutim poklopcem na  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon sušenja koje traje 3 sata od trenutka kada je postignuta temperatura od  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu te se zabilježi konačna masa za izračun suhe tvari odnosno vode.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema formuli:

$$\% \text{ vode} = (a-b) \cdot 100/m \quad (3)$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad (4)$$

Gdje su:

$a$  – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

$b$  – masa posudice s uzorkom posije sušenja (g)

$m$  – masa uzorka (g).

Na istom ispitnom uzorku moraju se obaviti najmanje 2 određivanja, koja se ne smiju razlikovati više od 0,2 % obzirom na udio vode odnosno udio suhe tvari.

### 3.2.5. Određivanje kemijskih svojstava

Za određivanje antioksidacijskih svojstava biljnih ekstrakata i pripremljenih emulzija potrebno je koristiti više različitih metoda (Mekinić i sur., 2014), stoga su korištene metode određivanja ukupnih polifenola, (eng. Total Polyphenol Content, TPC) i antioksidacijske aktivnosti koja uključuje DPPH metodu (sposobnost “hvatanja slobodnih radikala) i FRAP metodu (sposobnost reduciranja željeza).

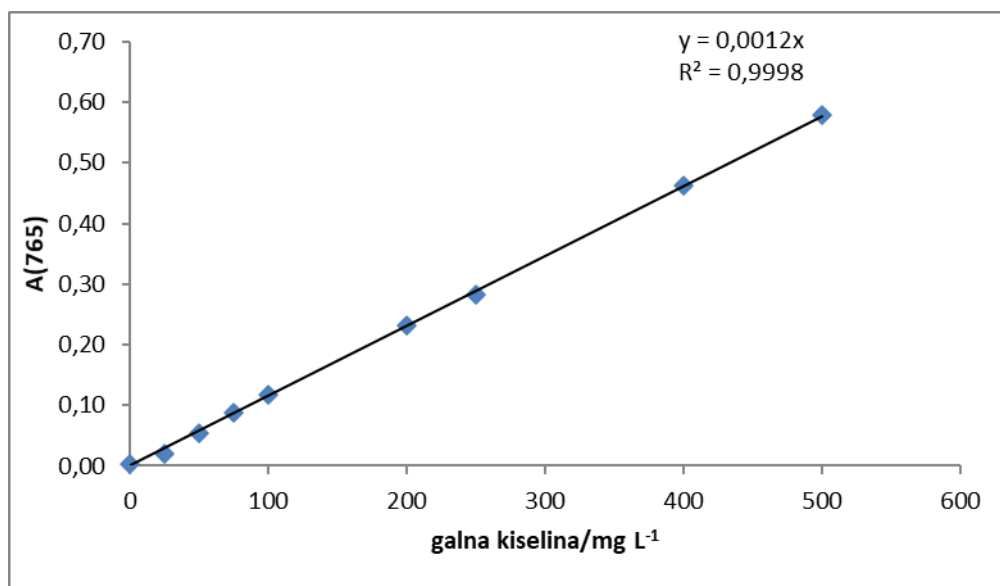
#### 3.2.5.1. *Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom*

Potrebno je pripremiti otopinu Folin-Ciocalteu reagensa razrijeđenog s destiliranom vodom u omjeru 1:2 i 20 %-tnu otopinu natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Reakcijska smjesa pripremi se pipetiranjem 7,9 mL destilirane vode, 100  $\mu\text{L}$  uzorka, 500  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa te dodatkom 1,5 mL 20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pokreće se reakcija, uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska) pri valnoj duljini  $\lambda = 765 \text{ nm}$ . Slijepa proba priprema se na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što se, umjesto

uzorka, dodaje 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

*Izrada baždarnog pravca:*

Udio ukupnih polifenola računa se na temelju jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka. Baždarni pravac izrađuje se na temelju izmjerenih apsorbancija za otopine galne kiseline različite koncentracije. Odvaja se 0,005 g galne kiseline u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Iz tako pripremljene ishodne otopine galne kiseline pripremaju se razrjeđenja koja odgovaraju koncentracijama galne kiseline 0 – 400  $\text{mg L}^{-1}$ . Umjesto uzorka, reakcijska smjesa sadrži 100  $\mu\text{L}$  otopine galne kiseline poznatih koncentracija. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe te se kao rezultat uzima srednja vrijednost. Baždarni pravac izrađuje se pomoću programa Microsoft Excel 2017. Na apscisi se nalaze koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 765 nm (slika 2). Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunaju se koncentracije ukupnih polifenola u uzorcima.



Slika 2. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Pri čemu je:

$x$  – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$y$  – apsorbancija (A) pri 765 nm

$R^2$  – koeficijent determinacije.

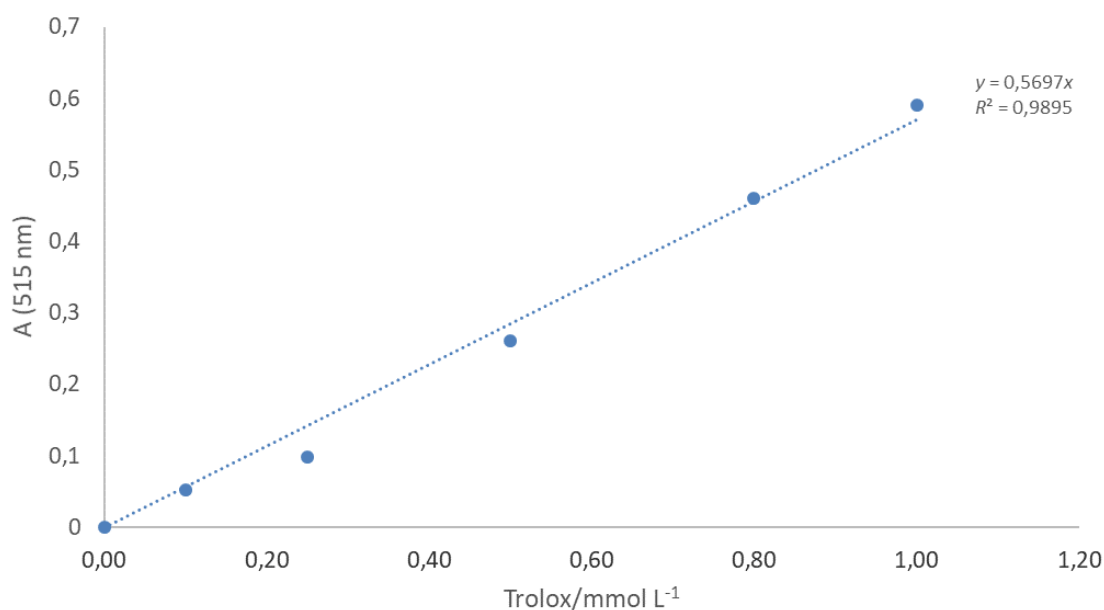


### 3.2.5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Pripremi se  $c = 0,094 \text{ mmol L}^{-1}$  otopina DPPH radikala u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetira se  $100 \mu\text{L}$  ispitivanog uzorka i doda  $3,9 \text{ mL } 0,094 \text{ mmol L}^{-1}$  otopine DPPH te dobro homogenizira na vorteksu. Reakcija se odvija 30 minuta u mraku nakon čega se mjeri apsorbanacija pri  $\lambda = 515 \text{ nm}$  u odnosu na slijepu probu koja, umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Antioksidacijska aktivnost računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca Troloxa a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata Troloxa po gramu suhe tvari uzorka. Postupak izrade baždarnog pravca (slika 3) je jednak protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto  $100 \mu\text{L}$  uzorka dodaje  $100 \mu\text{L}$  otopine Trolox-a poznate koncentracije ( $c = 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,8, 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe te se kao rezultat uzima srednja vrijednost. Promjena apsorbanacije ( $\Delta A$ ) računa se oduzimanjem apsorbanacije uzorka s Troloxom od apsorbanacije slijepe probe.



Slika 3. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode

Pri čemu je:

$x$  – ekvivalent Troloxa ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$y$  – razlika slijepe probe i apsorbancije uzorka pri 515 nm

$R^2$  – koeficijent determinacije.

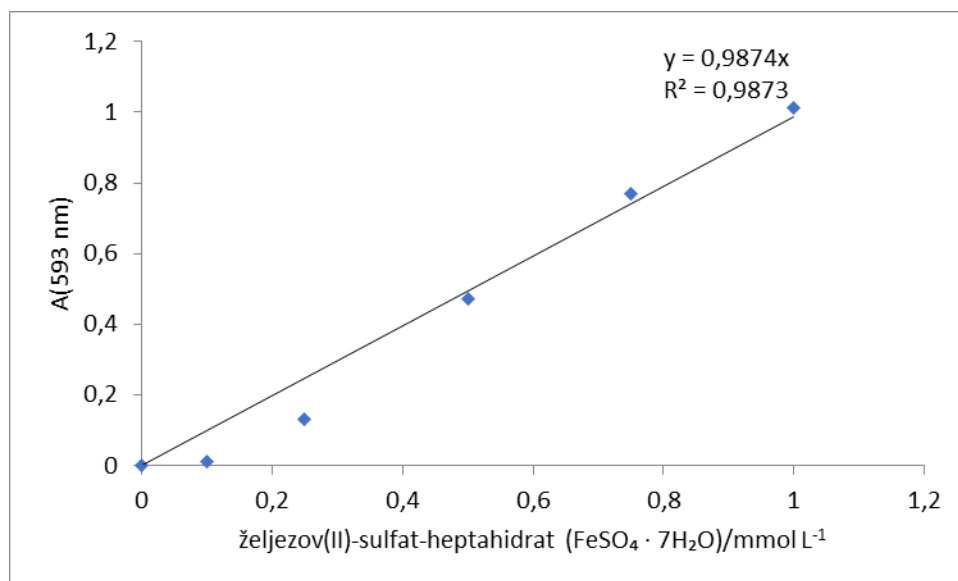
### 3.2.5.3. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom*

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije  $300 \text{ mmol L}^{-1}$ , otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) koncentracije  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , te vodenu otopinu željezovog(III) klorid heksahidrata ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) koncentracije  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ . FRAP reagens priprema se miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , tako da omjer dodanih otopina bude 10:1:1.

Za postupak mjerenja, u staklenoj peruveti se pomiješa 50  $\mu\text{L}$  uzorka i 950  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija pri  $\lambda = 593 \text{ nm}$ . Slijepe proba se priprema tako da se umjesto 50  $\mu\text{L}$  uzorka dodaje 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode i pomiješa s istom količinom FRAP reagensa. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe te se kao rezultat uzima srednja vrijednost. Antioksidacijska aktivnost računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $c = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  po volumenu ili masi uzorka.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Postupak izrade baždarnog dijagrama sastoji se od pripreme otopina željezovog(II) sulfat heptahidrata ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) poznate koncentracije ( $c = 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele na način da se umjesto 50  $\mu\text{L}$  uzorka dodaje jednaka količina otopine željezovog(II) sulfat heptahidrata ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) te se, kao rezultat, uzima srednja vrijednost. Promjena apsorbancije računa se oduzimanjem apsorbancije slijepe probe od apsorbancije uzorka koje sadrži  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Na temelju izmjerenih apsorbancija izradi se baždarni pravac uz pomoć programa Microsoft Excel 2017 koji na osi apscisa sadrži koncentracije otopina željezovog(II) sulfat heptahidrata ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), a na ordinati izračunate promjene apsorbanci (slika 4).



Slika 4. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode

Pri čemu je:

$x$  – ekvivalent  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$y$  – razlika uzorka i apsorbancije slijepe probe pri 593 nm

$R^2$  – koeficijent determinacije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu analizirana je *in vitro* stabilnost pet vrsta biljnih ekstrakata u tekućem obliku i u obliku emulzija: kadulje (*Salvia officinalis* L.), lavande (*Lavandula angustifolia*), majčine dušice (*Thymus serpyllum*), melise (*Melissa officinalis*) i mente (*Mentha x piperita*). Vodeni ekstrakti biljaka pripremljeni su klasičnom ekstrakcijom (ekstrakcija kruto-tekuće) dok su emulzije ulja u vodenom ekstraktu biljaka pripremane miješanjem suncokretovog ulja i biljnih ekstrakata uz dodatak emulgatora polietilen glikol različite molekulske mase (PEG1500, PEG6000 i PEG20000). Rezultati su prikazani pomoću tablica i grafički. Fizikalna svojstva (TDS, vodljivost i pH) biljnih ekstrakata i pripremljenih emulzija prikazani su u tablici 2. dok su fizikalna svojstva (TDS i vodljivost) biljnih ekstrakata i emulzija koje su propuštene kroz *in vitro* probavni sustav prikazani u tablici 3. Rezultati kemijskih analiza biljnih ekstrakata i pripremljenih emulzija prikazani su slikama 5-9 (ukupni polifenoli), slikama 10-14 (antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom) te slikama 15-19 (antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom). Na temelju podataka dobivenih kemijskom analizom biljnih ekstrakata i emulzija, izračunat je postotak preživljavanja za svaku vrstu biljnog uzorka te je uvršten u tablicu 4.

### 4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA I EMULZIJA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU BILJAKA PRIJE I NAKON *in vitro* SIMULACIJE PROBAVE

Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata i emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljaka s dodatkom emulgatora prije i nakon *in vitro* simulacije probavnog sustava prikazani su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata i pripremljenih emulzija ulje u biljnim ekstraktima s emulgatorom polietilen glikol (PEG1500, PEG6000, PEG20000) prije *in vitro* probave

		pH	vodljivost/mS cm <sup>-1</sup>	ukupne otopljene tvari/g L <sup>-1</sup>
Vodeni ekstrakt	Menta	5,85	1,586±0,16	0,676±0,08
	Majčina dušica	5,93	0,851±0,07	0,429±0,03
	Kadulja	5,57	1,338±0,14	0,651±0,07
	Melisa	5,77	1,764±0,18	0,873±0,09
	Lavanda	5,07	1,307±0,13	0,650±0,06
Mikroemulzije uz emulgator PEG1500	Menta	6,01	0,145±0,004	0,073±0,002
	Majčina dušica	6,09	0,074±0,002	0,037±0,001
	Kadulja	5,81	0,147±0,005	0,074±0,003
	Melisa	6,13	0,184±0,006	0,092±0,003
	Lavanda	5,71	0,079±0,052	0,040±0,003
Mikroemulzije uz emulgator PEG6000	Menta	5,86	0,176±0,005	0,088±0,003
	Majčina dušica	5,99	0,063±0,001	0,032±0,0007
	Kadulja	5,75	0,113±0,004	0,057±0,002
	Melisa	5,89	0,186±0,007	0,093±0,004
	Lavanda	5,20	0,099±0,003	0,050±0,002
Mikroemulzije uz emulgator PEG20000	Menta	5,73	0,134±0,006	0,067±0,003
	Majčina dušica	6,00	0,071±0,002	0,036±0,001
	Kadulja	5,54	0,117±0,004	0,059±0,002
	Melisa	5,78	0,163±0,004	0,082±0,002
	Lavanda	5,09	0,114±0,004	0,057±0,002

pH vrijednosti za biljne ekstrakte kreću se u rasponu od 5,07 do 5,93. U usporedbi sa pH vrijednošću pripremljenih emulzija ne uočava se značajna razlika iako su pH vrijednosti pripremljenih emulzija nešto više (tablica 2). Dobivene vrijednosti ne odstupaju značajno od pH vrijednosti koje su izmjerene za iste biljne vrste (4,56 – 6,82) u istraživanju autora Marić

(2017) dok je u istraživanju Sarić (2020) izmjeren raspon pH vrijednosti istih biljnih vrsta od 4,96 do 6,18.

Najviše vrijednosti vodljivosti i TDS-a izmjerene su za melisu (vodljivost =  $1,764 \text{ mS cm}^{-1}$  odn. TDS =  $0,873 \text{ g L}^{-1}$ ) dok su najniže vrijednosti izmjerene za majčinu dušicu (vodljivost =  $0,851 \text{ mS cm}^{-1}$  odn. TDS =  $0,429 \text{ g L}^{-1}$ ) (tablica 2). Vrijednosti vodljivosti za biljne ekstrakte kreću se u rasponu od  $0,851 \text{ mS cm}^{-1}$  do  $1,764 \text{ mS cm}^{-1}$ , a vrijednosti TDS-a kreću se u rasponu od  $0,429 \text{ g L}^{-1}$  do  $0,873 \text{ g L}^{-1}$ . Prema Sarić (2020), vrijednosti vodljivosti za biljne ekstrakte kretale su se u rasponu od  $0,986 \text{ mS cm}^{-1}$  (kadulja) do  $1,642 \text{ mS cm}^{-1}$  (melisa). U ovom radu, značajno više vrijednosti vodljivosti i TDS-a izmjerene su za biljne ekstrakte u odnosu na pripremljene emulzije (tablica 2). Vodljivost je mjera kojom se iskazuje sposobnost otopine da provodi električnu struju te je određuju prisutnost slabih elektrolita, pH i temperatura. Razlika u pH vrijednosti te interakcije polifenola sa uljem i emulgatorom polietilen glikolom smanjile su sposobnost emulgiranih uzoraka da provode električnu struju u usporedbi s neemulgiranim uzorcima (Jurinjak Tušek i sur., 2020).

pH vrijednosti za pripremljene emulzije ulje u vodenim biljnim ekstraktima s dodatkom emulgatora PEG1500 izmjerene su u rasponu od 5,71 do 6,13; s dodatkom emulgatora PEG6000 kreću se u rasponu od 5,20 do 5,99 dok su izmjerene pH vrijednosti za emulzije u kojima je dodan emulgator PEG20000 u rasponu od 5,09 do 6,00 (tablica 2). Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka može se zaključiti kako su se pH vrijednosti pripremljenih emulzija s biljnim ekstraktima smanjivale povećanjem molekulske mase polietilen glikola. Također je najniža pH vrijednost izmjerena za emulziju koja je pripremana s vodenim ekstraktom lavande uz dodatak PEG20000 (5,09) dok je najviša pH vrijednost izmjerena za emulziju pripremanu s vodenim ekstraktom majčine dušice uz dodatak PEG1500 (6,09) (tablica 2).

Najviše vrijednosti vodljivosti izmjerene su za emulzije ulje u vodenom ekstraktu melise, uz dodatak sva tri emulgatora: zatim slijede menta, kadulja i lavanda dok su najniže vrijednosti vodljivosti izmjerene za majčinu dušicu. Izmjerene vrijednosti vodljivosti u korelaciji su s vrijednostima za ukupne otopljene tvari (tablica 2) (Sarić, 2020; Cvetković i sur., 2018). Najviše otopljenih tvari sadržavale su emulzije ulje u vodenom ekstraktu melise ( $0,092 \text{ g L}^{-1}$  uz dodatak PEG1500;  $0,093 \text{ g L}^{-1}$  uz dodatak PEG6000;  $0,082 \text{ g L}^{-1}$  uz dodatak PEG20000) dok su najmanje otopljenih tvari sadržavale emulzije ulje u vodenom ekstraktu majčine dušice ( $0,037 \text{ g L}^{-1}$  uz dodatak PEG1500;  $0,032 \text{ g L}^{-1}$  uz dodatak PEG6000;  $0,036 \text{ g L}^{-1}$  uz dodatak

PEG20000). Na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata vidljivo je da postoji pozitivna korelacija između izmjerenih vrijednosti TDS-a i vodljivosti sa ukupnim polifenolima: najviše vrijednosti TDS-a i vodljivosti (tablica 2) kao i najviše vrijednosti UF-a izmjerene su za melisu (slika 8), dok su najniže vrijednosti TDS-a i vodljivosti, kao i najniže vrijednosti UF-a, izmjerene za majčinu dušicu (slika 6). Prema Benković i sur. (2016) postoji snažna korelacija između ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti sa ukupnim polifenolima (UF) i antioksidacijskom aktivnošću u ekstraktima kamilice (*Matricaria recutita* L.).

Tablica 3. Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata i pripremljenih emulzija ulje u biljnim ekstraktima s emulgatorom polietilen glikol (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon *in vitro* probave

	MENTA		MAJČINA DUŠICA		KADULJA		MELISA		LAVANDA	
	TDS [g L <sup>-1</sup> ]	Vodljivost [mS cm <sup>-1</sup> ]	TDS [g L <sup>-1</sup> ]	Vodljivost [mS cm <sup>-1</sup> ]	TDS [g L <sup>-1</sup> ]	Vodljivost [mS cm <sup>-1</sup> ]	TDS [g L <sup>-1</sup> ]	Vodljivost [mS cm <sup>-1</sup> ]	TDS [g L <sup>-1</sup> ]	Vodljivost [mS cm <sup>-1</sup> ]
biljni ekstrakt										
usta	1,19±0,12	2,42±0,24	1,29±0,13	2,56±0,26	1,13±0,11	2,45±0,24	1,29±0,13	2,00±0,20	1,24±0,12	2,48±0,25
želudac	2,28±0,23	4,64±0,46	2,35±0,23	5,02±0,50	2,39±0,24	4,84±0,48	2,30±0,23	4,84±0,48	2,42±0,24	4,78±0,48
duodenum	2,79±0,28	5,52±0,52	2,75±0,75	5,59±0,56	2,58±0,26	5,13±0,51	2,45±0,25	5,37±0,54	2,54±0,25	5,67±0,57
PEG1500										
usta	2,01±0,20	3,39±0,34	1,89±0,19	3,26±0,33	1,76±0,18	4,19±0,42	2,01±0,20	3,09±0,31	1,60±0,16	4,95±0,50
želudac	3,01±0,30	5,02±0,50	2,94±0,29	5,37±0,54	2,72±0,27	6,08±0,61	2,81±0,28	5,55±0,55	2,46±0,25	4,95±0,50
duodenum	3,50±0,35	6,73±0,67	3,79±0,38	6,80±0,68	3,72±0,37	6,72±0,67	2,51±0,25	6,38±0,64	3,02±0,30	5,45±0,55

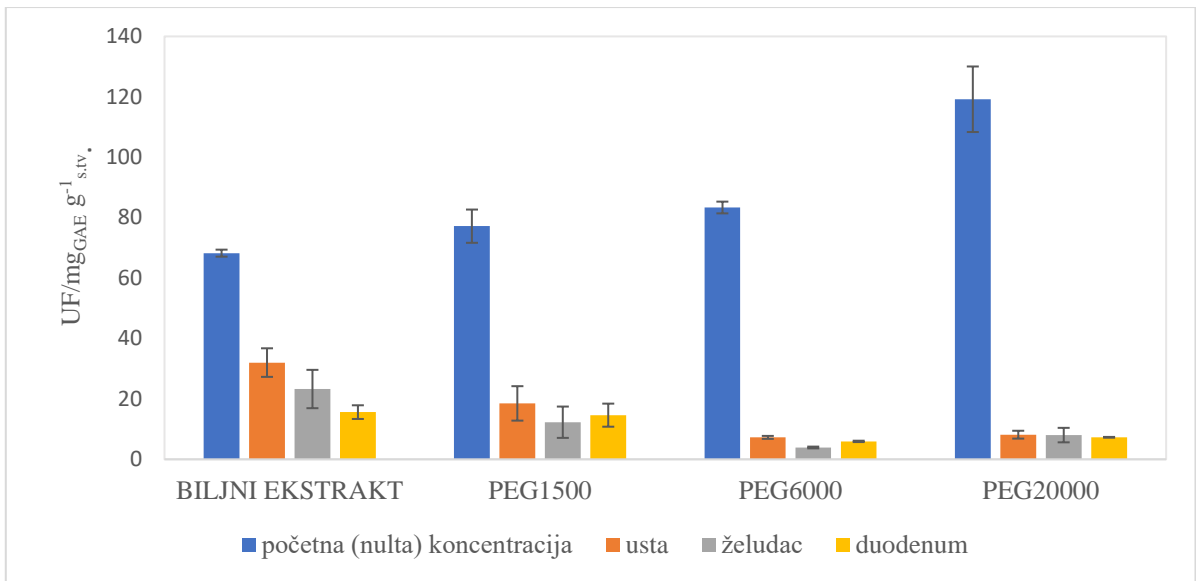


PEG6000										
usta	2,79±0,28	5,51±0,55	2,45±0,25	5,50±0,55	2,87±0,29	5,32±0,53	2,51±0,25	5,29±0,53	2,57±0,26	4,91±0,49
želudac	4,95±0,50	10,01±1,00	4,35±0,44	9,33±0,93	4,24±0,42	8,44±0,84	4,07±0,41	8,29±0,83	4,17±0,42	7,84±0,78
duodenum	6,18±0,62	12,85±1,29	5,11±0,51	10,00±1,00	4,73±0,47	9,68±0,97	4,74±0,47	10,23±1,02	4,86±0,49	9,51±0,95
PEG20000										
usta	2,65±0,27	5,33±0,53	2,45±0,25	4,40±0,44	2,53±0,25	5,25±0,53	2,39±0,24	4,95±0,50	2,33±0,223	5,03±0,20
želudac	4,50±0,45	8,25±0,83	4,20±0,42	8,35±0,84	3,63±0,36	7,18±0,72	4,01±0,40	7,94±0,79	3,92±0,39	8,15±0,81
duodenum	4,93±0,49	9,76±0,98	4,51±0,45	9,16±0,92	4,48±0,45	8,63±0,86	4,80±0,48	9,72±0,97	4,56±0,46	9,13±0,91

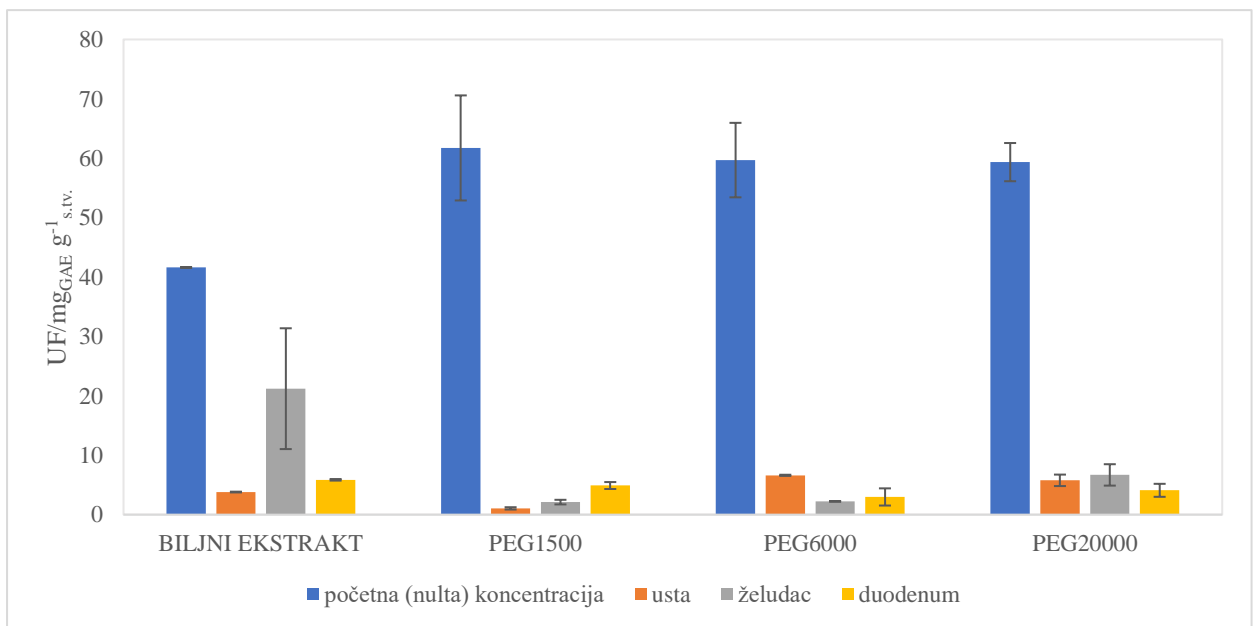
*In vitro* simulacija probavnog sustava sastoji se od tri dijela: usne šupljine, želuca i tankog crijeva. Uvjeti probave su simulirani na način da je temperatura medija podešavana na 37 °C, promjenom pH vrijednosti prilikom prelaska iz jednog odjeljka u drugi te dodavanjem probavnih enzima koji su karakteristični za svaki dio sustava. Sukladno očekivanjima, vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava (tablica 3) povećale su se za analizirane biljne ekstrakte i emulzije što je i očekivano uslijed dodatka pufera, klorovodične kiseline, enzima i žučnih soli kroz svaki odjeljak *in vitro* probave. Maksimalne vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari izmjerene su za tanko crijevo (duodenum). Također je primijećen trend povećanja vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari kod pripremljenih emulzija s obzirom na dodani emulgator te su uzorci emulzija sa emulgatorom PEG6000 imale veće vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari za svaki provedeni korak *in vitro* probave, u odnosu na uzorke emulzija koje su sadržavale emulgator PEG1500 i PEG20000.

#### 4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA I EMULZIJA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU BILJAKA NAKON *in vitro* SIMULACIJE PROBAVE

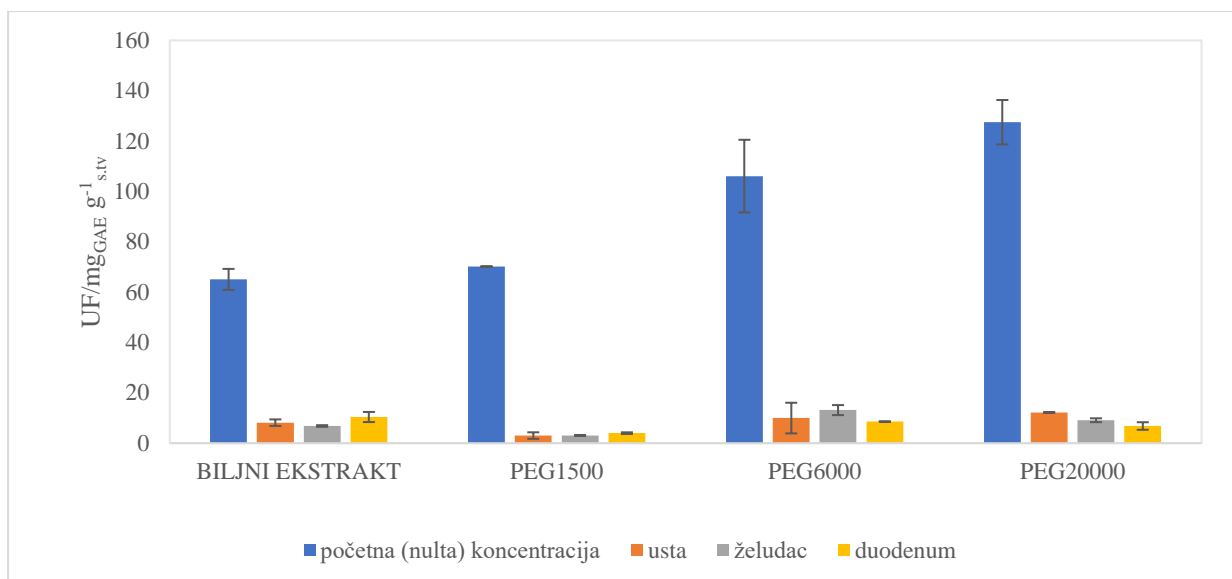
Kemijska svojstva (UF, DPPH i FRAP) biljnih ekstrakata i emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljaka s dodatkom emulgatora nakon *in vitro* simulacije probavnog sustava prikazana su na slikama 5-19. Rezultati dobiveni analizom početnih uzoraka (ekstrakata ili emulzija) označeni su kao nulte koncentracije.



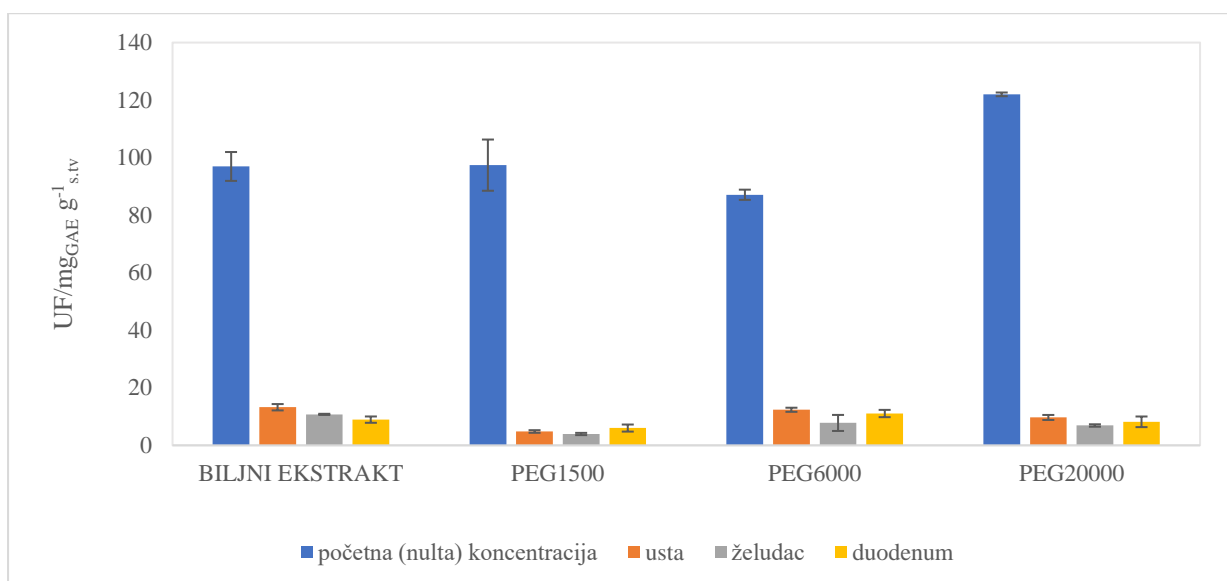
Slika 5. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih polifenola (UF) za tekući ekstrakt mente i emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



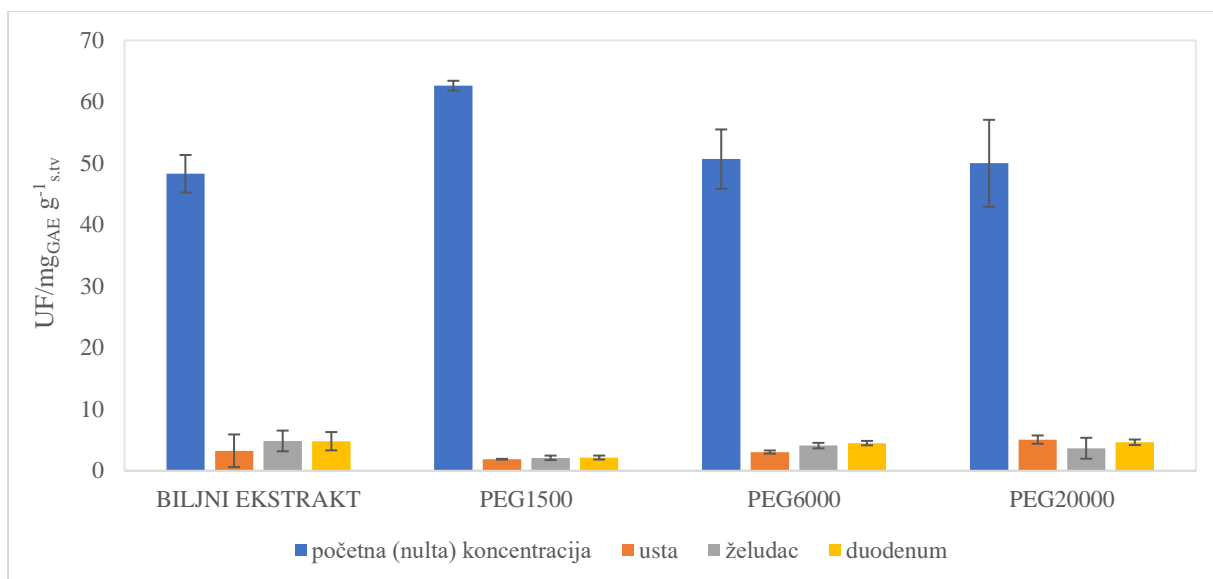
Slika 6. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih polifenola (UF) za tekući ekstrakt majčine dušice i emulzije ulje u vodenom ekstraktu majčine dušice s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 7. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih polifenola (UF) za tekući ekstrakt kadulje i emulzije ulje u vodenom ekstraktu kadulje s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 8. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih polifenola (UF) za tekući ekstrakt melise i emulzije ulje u vodenom ekstraktu melise s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 9. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih polifenola (UF) za tekući ekstrakt lavande i emulzije ulje u vodenom ekstraktu lavande s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

Na slikama 5 do 9 prikazane su početne (nulte) vrijednosti UF za biljne ekstrakte i pripremljene emulzije te vrijednosti UF nakon prolaska kroz probavni sustav *in vitro*. Biljni ekstrakt melise pokazuje najviše početne vrijednosti udjela ukupnih polifenola (UF) ( $96,934 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ), nakon čega slijede menta, kadulja i lavanda, dok je najniža vrijednost UF zabilježena za biljni ekstrakt majčine dušice ( $41,612 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ). Takvi rezultati djelomično su u skladu sa rezultatima istraživanja Sarić (2020) gdje su najviše vrijednosti UF također zabilježene za vodeni ekstrakt melise ( $73,75 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ), a zatim slijede kadulja, menta, majčina dušica te lavanda  $22,50 \text{ (mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.)}$ . U istraživanju autora Jurinjak Tušek i sur. (2020) najviše vrijednosti UF dobivene su za majčinu dušicu ( $188 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ) dok su najniže vrijednosti dobivene za kadulju ( $58 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ). Različitosti između rezultata ovog istraživanja i istraživanja autora Jurinjak Tušek i sur. (2020) mogu se pripisati različitoj godini berbe istraživanog biljnog materijala. Stagos i sur. (2012) su, pri određivanju udjela ukupnih polifenola vodenih ekstrakata 24 biljaka grčkih domaćih vrsta porodice *Lamiaceae*, dobili vrijednosti koje su se kretale u rasponu od  $90 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$  do  $575 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ . Aprotosoae i sur. (2013), ispitali su utjecaj otapala (70 %-tni i 50 %-tni etanol) na udio polifenola porijeklom iz biljaka porodice *Lamiaceae* (melisa, lavanda, menta, majčina dušica, kadulja i ružmarin). Pri tome su se izmjerene vrijednosti ukupnih polifenola kretale u rasponu od  $30,7 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$

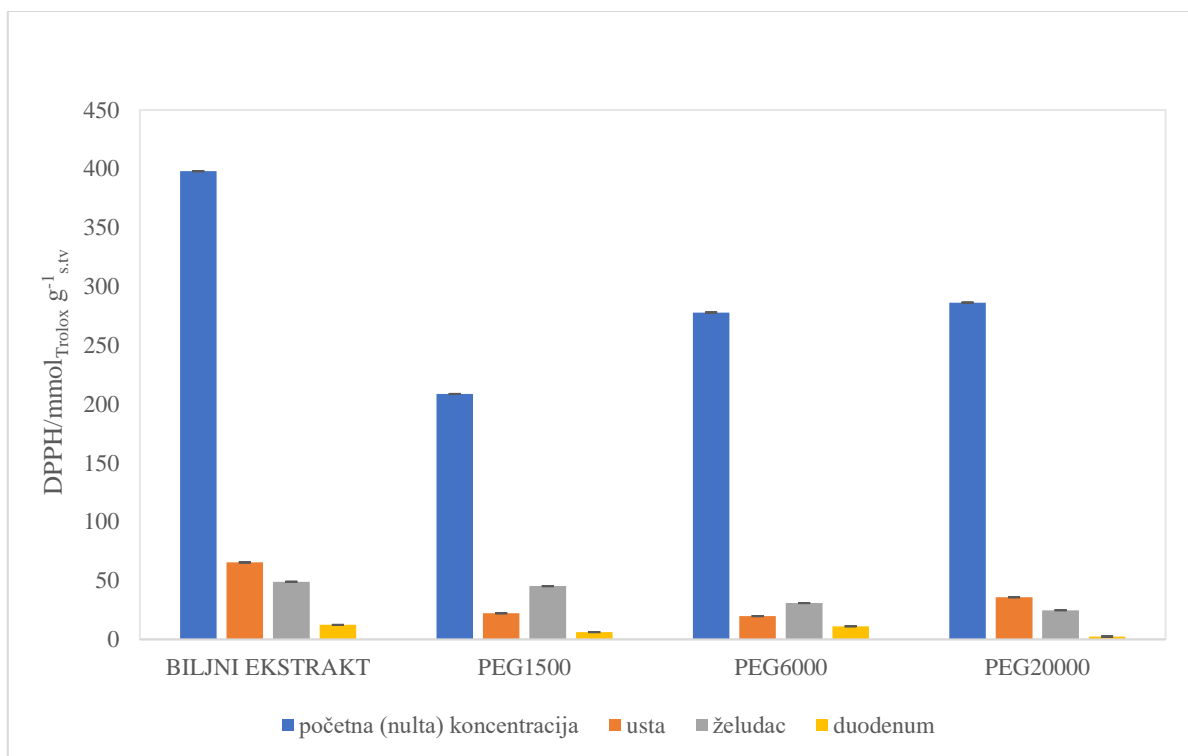
za lavandu do 51,6 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> za melisu korištenjem 70 %-tnog etanola te u rasponu od 31,0 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> za lavandu do 65,1 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> za melisu korištenjem 50 %-tnog etanola. U usporedbi sa izmjerenim vrijednostima u vodenim biljnim ekstraktima u ovom istraživanju, vrijednosti ukupnih polifenola etanolnih ekstrakata su niže, što se pripisuje različitoj topivosti polifenolnih spojeva u različitim otapalima.

Početne (nulte) vrijednosti UF emulgiranih biljnih ekstrakata s dodatkom PEG emulgatora više su, u usporedbi s početnim vrijednostima biljnih ekstrakata (slike 5-9). Za emulzije ulje u vodenim biljnim ekstraktima s dodatkom PEG1500, udio UF kretao se u rasponu od 61,736 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (majčina dušica) do 97,392 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (melisa). U emulgiranim ekstraktima s dodatkom PEG6000, udio UF kretao se u rasponu od 50,697 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (lavanda) do 106,094 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (kadulja) dok su za emulgirane ekstrakte s dodatkom PEG20000 vrijednosti UF bile u rasponu od 50,015 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (lavanda) do 127,516 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (kadulja). Na temelju dobivenih vrijednosti može se uočiti trend povećanja udjela UF povećanjem molekulske mase polietilen glikola (PEG20000>PEG6000>PEG1500).

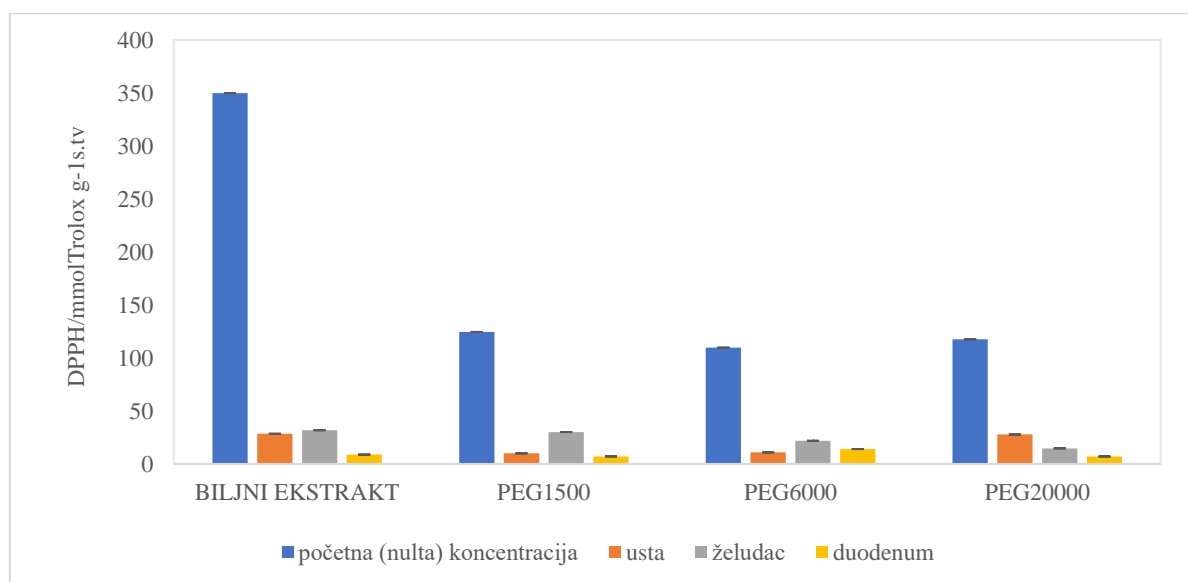
Vrijednosti UF-a, nakon prvog koraka *in vitro* probave (usta), značajno su niže u uzorcima biljnih ekstrakata kao i u emulgiranim biljnim ekstraktima s dodatkom PEG-a (PEG1500, PEG6000, PEG20000) za sve ispitivane biljke (slike 5-9). Od biljnih ekstrakata, najveći pad koncentracije UF uočen je kod lavande (3,252 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>) dok je najmanji pad uočen kod mente (32,016 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>) u odnosu na početnu (nultu) koncentraciju. Što se emulgiranih biljnih ekstrakata tiče, najveći pad koncentracije UF, nakon prvog koraka *in vitro* probave, dobiven je kod emulzija ulje u vodenom ekstraktu lavande s dodatkom PEG1500 (1,878 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>) dok je najmanji pad koncentracije UF dobiven kod emulzija ulje u vodenom ekstraktu majčine dušice s dodatkom PEG6000 (6,617 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>). Vrijednosti udjela UF-a nakon završenog drugog koraka *in vitro* probave (želudac) pokazuju uglavnom padajući trend u uzorcima biljnih ekstrakata, uz iznimku majčine dušice. Što se emulgiranih biljnih ekstrakata tiče, udjeli UF također pokazuju padajući trend, uz iznimku emulzije ulje u vodenom ekstraktu kadulje s dodatkom PEG6000 (13,148 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>) (slika 7). Vrijednosti udjela UF nakon završenog trećeg koraka *in vitro* probave (duodenum) pokazuju rastući trend za emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom PEG1500 (14,611 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>) i PEG6000 (5,931 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>), emulziju ulje u vodenom ekstraktu majčine dušice s dodatkom PEG1500 (4,901 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>), emulzije ulje u vodenom ekstraktu melise s dodatkom PEG1500 (6,000 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>), PEG6000 (11,055 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>) i PEG20000 (8,171 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>) te emulziju ulje u vodenom ekstraktu lavande s dodatkom PEG20000 (4,638 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>). Što se tiče biljnih ekstrakata, rastući trend UF pokazuje ekstrakt kadulje (10,397 mg<sub>GAE</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub>), dok ostali biljni

ekstrakti pokazuju padajući trend, odn. smanjenje udjela UF, nakon završenog zadnjeg (trećeg) koraka probave. Uspoređujući vrijednosti UF-a prije (početna koncentracija) te nakon završene *in vitro* probave (koncentracija u duodenumu) moguće je primijetiti da su najveći stupanj očuvanja ukupnih polifenola, od emulgiranih uzoraka, imali uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom mente uz dodatak PEG1500 (slika 5), te uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom melise uz dodatak PEG6000 (slika 8). Što se biljnih ekstrakata tiče, najveći stupanj očuvanja UF pokazali su uzorci mente (slika 5) i kadulje (slika 7).

Folin-Ciocalteu reagens može reagirati sa drugim reducirajućim spojevima koji nisu polifenoli zbog čega može doći do precijenjene vrijednosti ukupnog sadržaja polifenola (Brglez Mojzer i sur., 2016). Prilikom provođenja ove metode u uzorcima u kojima je bio prisutan polietilen glikol došlo je stvaranja bijelog taloga. Polietilen glikol ima sposobnost reagiranja s proteinima pri čemu dolazi do njihova taloženja (McPherson, 1976). Međutim uzorci korišteni u ovom istraživanju ne bi trebali sadržavati količine proteina dovoljne kako bi došlo do interakcija protein – polietilen glikol pa možemo zaključiti da postoje i druge komponente reakcijske smjese među kojima je moglo doći do interakcija koje bi dovele do stvaranja bijelog taloga. Stoga bi za uzorke koji sadrže polietilen glikol i vodene ekstrakte biljaka bogate polifenolima bila prikladnija druga metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola (UF). Prema Brglez Mojzer i sur. (2016) najčešće korištene metode za određivanje udjela polifenola su tekuća kromatografija visoke učinkovitosti (eng. high-performance liquid chromatography, HPLC) i plinska kromatografija (eng. gas chromatography, GC).

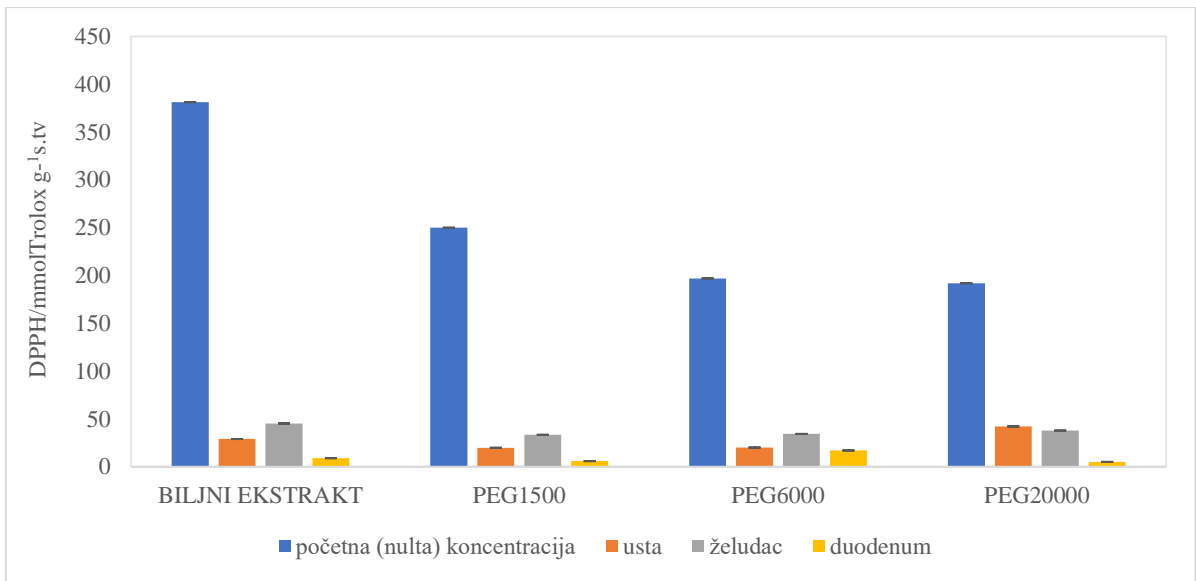


Slika 10. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za tekući ekstrakt mente i emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

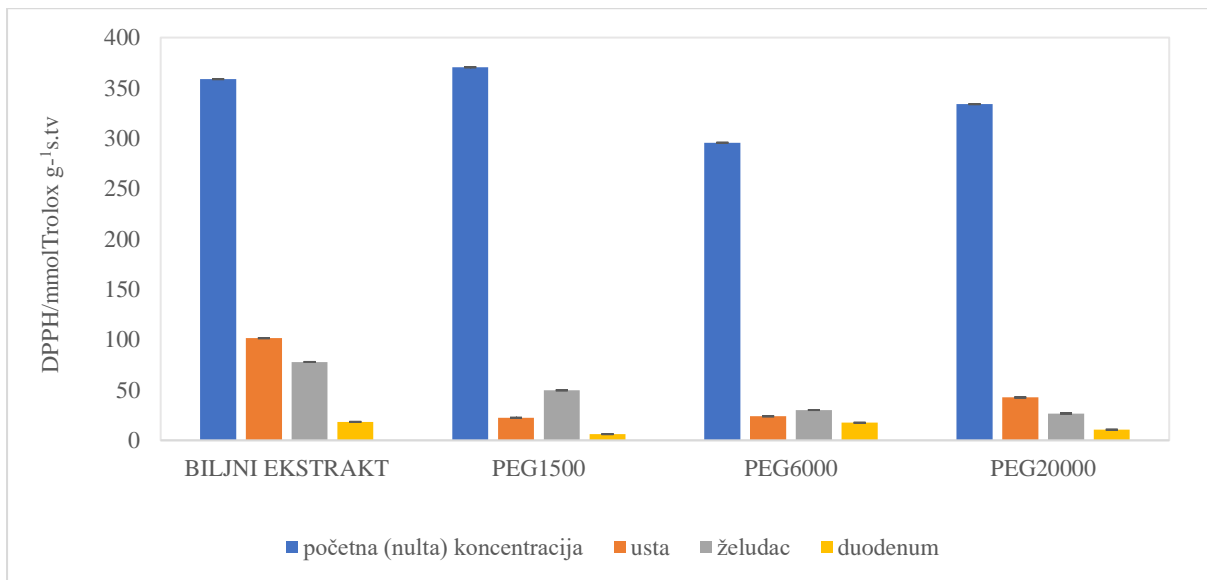


Slika 11. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za tekući ekstrakt majčine dušice i emulzije ulje u vodenom ekstraktu majčine dušice dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

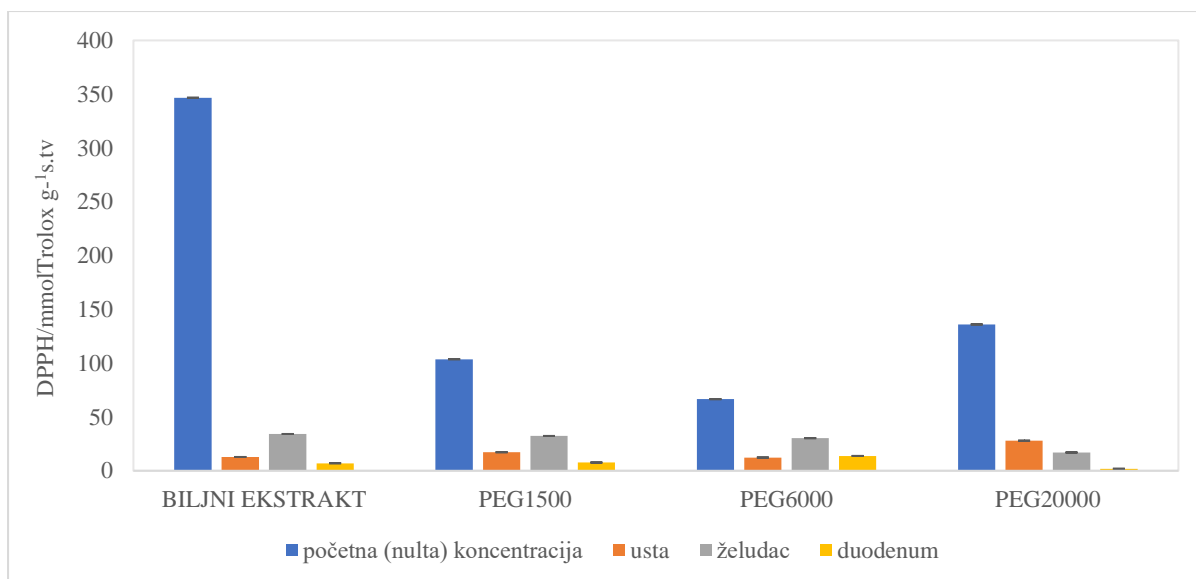




Slika 12. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za tekući ekstrakt kadulje i emulzije ulje u vodenom ekstraktu kadulje dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 13. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za tekući ekstrakt melise i emulzije ulje u vodenom ekstraktu melise dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



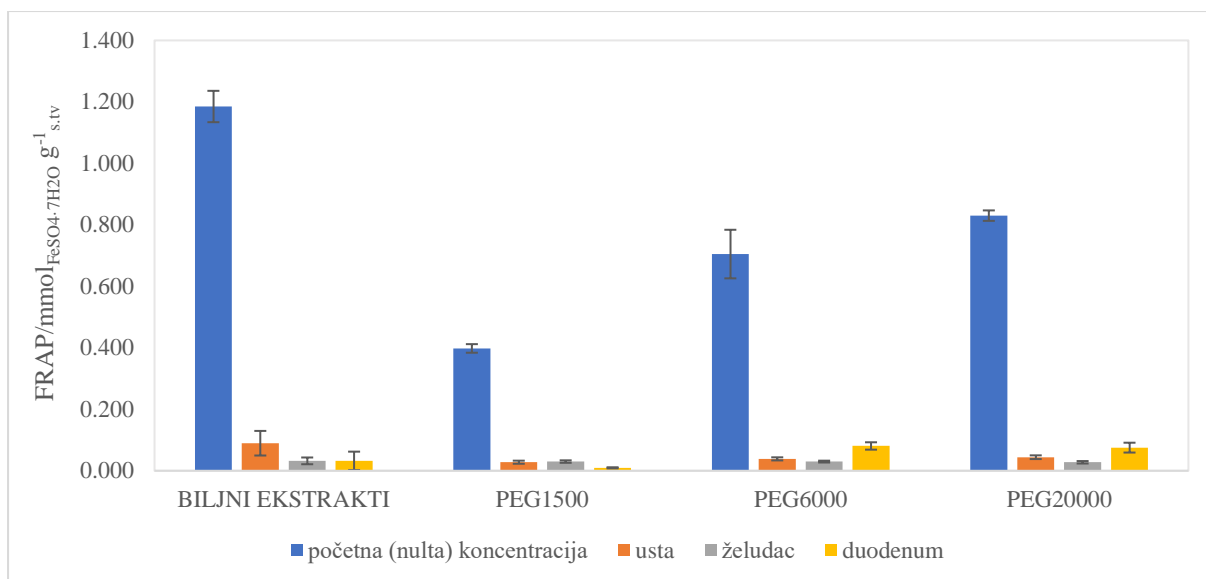
Slika 14. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za tekući ekstrakt lavande i emulzije ulje u vodenom ekstraktu lavande dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom za biljne ekstrakte prije *in vitro* probave pokazuje različit trend (slike 10-14). Najviše početne (nulte) vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene DPPH metodom izmjerene su za biljni ekstrakt mente ( $0,398 \text{ mmol}_{\text{trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ), zatim slijede kadulja ( $0,381 \text{ mmol}_{\text{trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ), melisa ( $0,359 \text{ mmol}_{\text{trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ) i majčina dušica ( $0,350 \text{ mmol}_{\text{trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ) dok je najniža početna vrijednost zabilježena za biljni ekstrakt lavande ( $0,347 \text{ mmol}_{\text{trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$ ). Generalić Mekinić i sur. (2014) određivali su antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom za biljne ekstrakte porodice *Lamiaceae* te je najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena za melisu ( $233 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ L}^{-1}$ ).

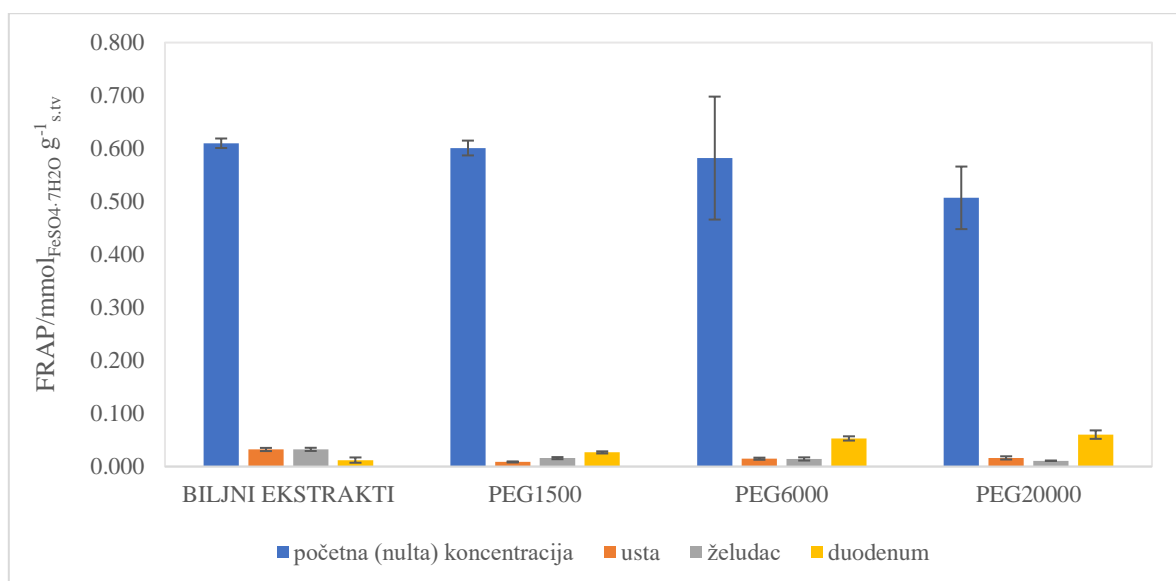
Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom za emulgirane biljne ekstrakte također pokazuje promjene u odnosu na biljne ekstrakte (slike 10-14). Raspon početnih DPPH vrijednosti za emulgirane biljne ekstrakte uz dodatak emulgatora PEG1500 nešto je niži: od  $0,104 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$  (lavanda) do  $0,370 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$  (melisa). Za emulgirane biljne ekstrakte uz dodatak emulgatora PEG6000 taj raspon iznosi od  $0,066 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$  (lavanda) do  $0,295 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$  (melisa) dok raspon početnih DPPH vrijednosti za emulgirane biljne ekstrakte uz dodatak PEG20000 iznosi  $0,117 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$  (majčina dušica) do  $0,334 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.t.v.}$  (melisa).

DPPH vrijednosti biljnih i emulgiranih ekstrakata tijekom i nakon *in vitro* probave značajno su niže u odnosu na njihove početne DPPH vrijednosti (slike 10-14). Dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) smanjile su se početne DPPH vrijednosti emulgiranih ekstrakata u odnosu na početne vrijednosti biljnih ekstrakata, uz iznimku biljnih i emulgiranih ekstrakata melise, koja bilježi visoke početne DPPH vrijednosti (slika 13). Najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom za biljne i emulgirane biljne ekstrakte, uz dodatak sva tri emulgatora, izmjerene su za lavandu prije i tijekom *in vitro* probave (slika 14). Mogući razlog tome su cvjetovi i lišće lavande koji su bogati esencijalnim uljima iz kojih se bioaktivne komponente ne mogu ekstrahirati sa vodom kao otapalom (Jurinjak Tušek i sur., 2020). Tijekom *in vitro* probave (u drugom koraku-želucu), najviše DPPH vrijednosti za sve uzorke biljnih i emulgiranih ekstrakata su izmjerene u želucu (Slike 10-14). DPPH vrijednosti za uzorke biljnih ekstrakata najniže su za majčinu dušicu ( $0,032 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ) a najviše su za melisu ( $0,078 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ). Što se tiče emulzija ulje u vodenim biljnim ekstraktima s emulgatorom PEG1500, DPPH vrijednosti najniže su za lavandu ( $0,032 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ), a najviše za melisu ( $0,050 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ). Što se tiče emulzija ulje u vodenim biljnim ekstraktima s emulgatorom PEG6000, DPPH vrijednosti iznose  $0,022 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za majčinu dušicu te  $0,034 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za kadulju. Što se tiče emulzija ulje u vodenim biljnim ekstraktima s emulgatorom PEG20000, DPPH vrijednosti iznose  $0,015 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za majčinu dušicu te  $0,038 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za kadulju. Najviša postignuta antioksidacijska aktivnost u želucu pripisuje se uvjetima pH, te razlikama u sposobnosti pojedinih biljaka da reduciraju DPPH zbog različitog udjela bioaktivnih komponenata.

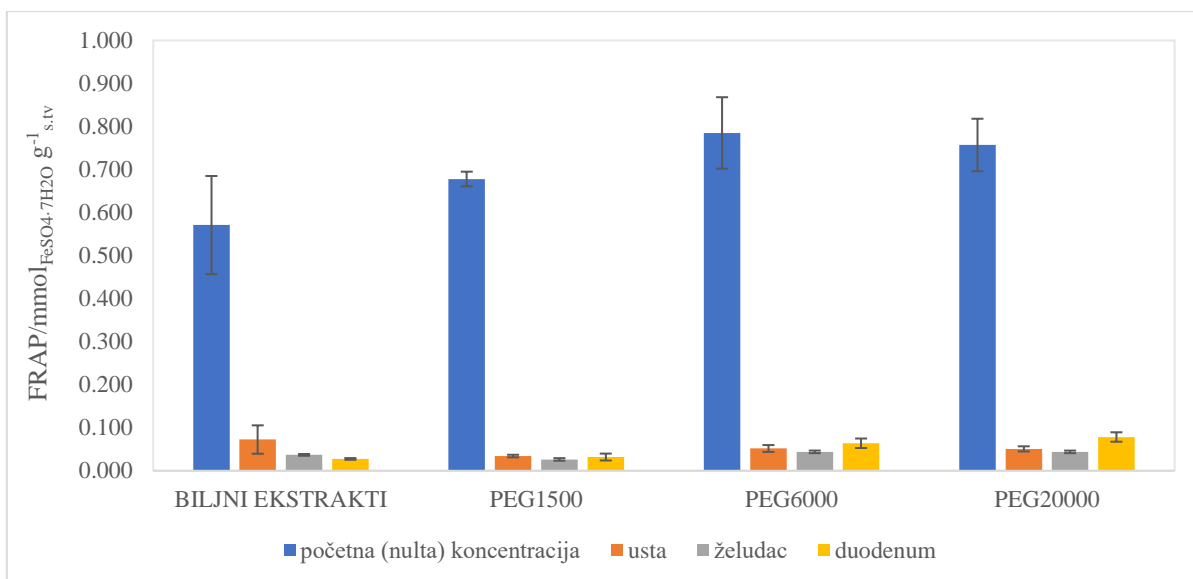
Uspoređujući DPPH vrijednosti prije (početna koncentracija) te nakon završene *in vitro* probave (koncentracija u duodenumu) moguće je primijetiti da su najveći stupanj očuvanja antioksidacijske aktivnosti, od emulgiranih uzoraka, imali uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom majčine dušice uz dodatak PEG600 (slika 11), uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom kadulje uz dodatak PEG6000 (slika 12) te uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom lavande uz dodatak emulgatora PEG1500 i PEG6000 (slika 14).



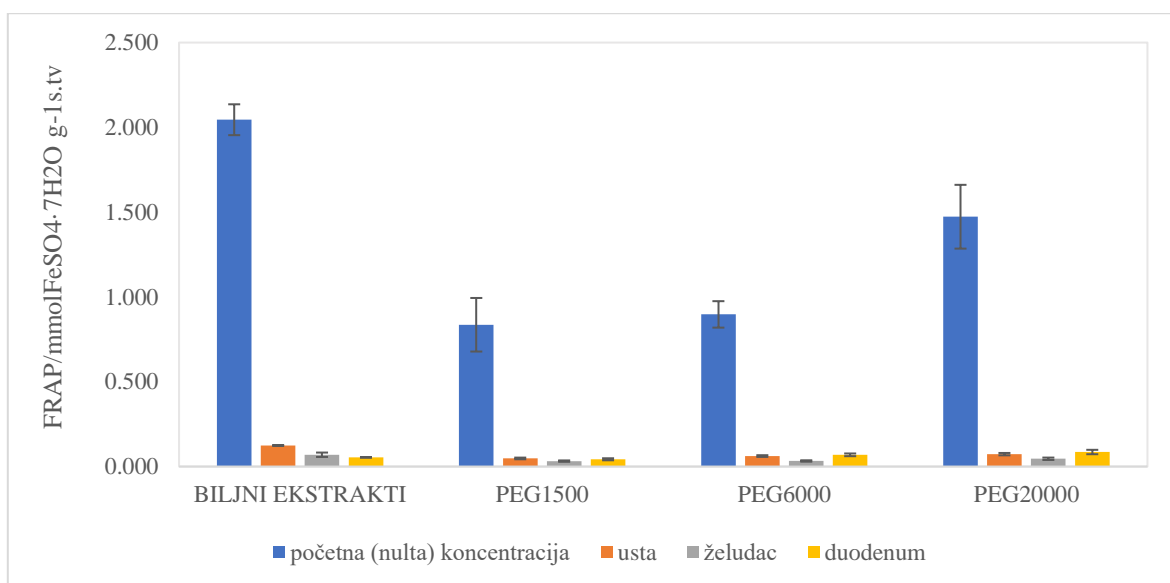
Slika 15. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za tekući ekstrakt mente i emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



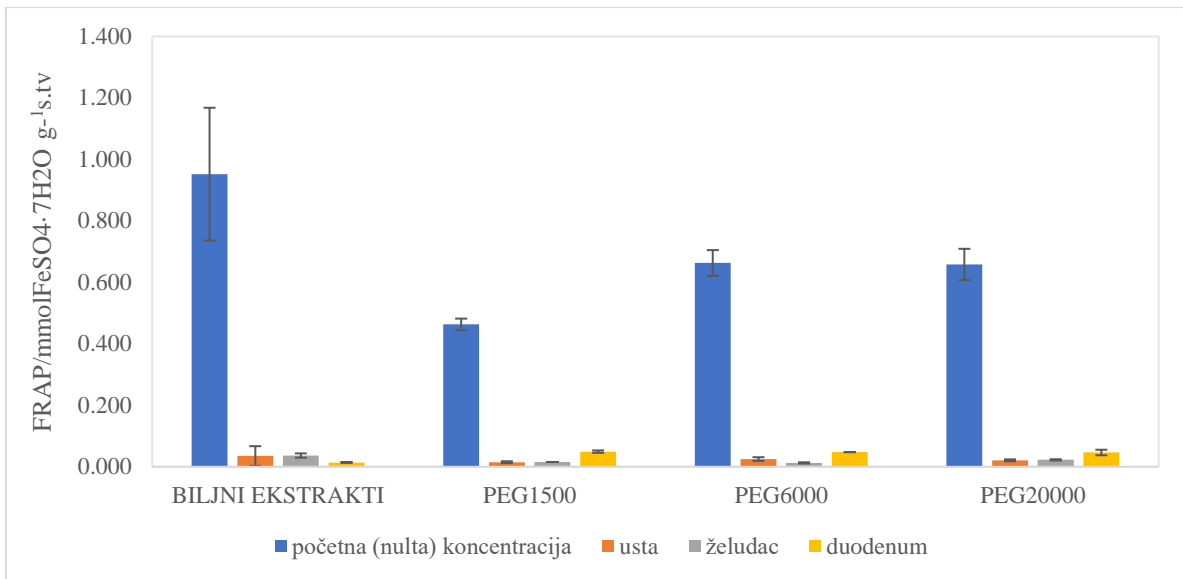
Slika 16. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za tekući ekstrakt majčine dušice i emulzije ulje u vodenom ekstraktu majčine dušice s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 17. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za tekući ekstrakt kadulje i emulzije ulje u vodenom ekstraktu kadulje s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 18. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za tekući ekstrakt melise i emulzije ulje u vodenom ekstraktu melise s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 19. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za tekući ekstrakt lavande i emulzije ulje u vodenom ekstraktu lavande s dodatkom emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

Početne (nulte) vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom za biljne ekstrakte kreću se u rasponu od 0,571 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (kadulja) do 2,045 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (melisa). Za emulgirane biljne ekstrakte s emulgatorom PEG1500 početne vrijednosti u rasponu su od 0,398 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (menta) do 0,836 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (melisa). Za emulgirane biljne ekstrakte s emulgatorom PEG6000 početne vrijednosti su u rasponu od 0,582 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (majčina dušica) do 0,897 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (melisa) dok su za emulgirane biljne ekstrakte s emulgatorom PEG20000 početne vrijednosti u rasponu od 0,507 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (majčina dušica) do 1,473 mmol<sub>FeSO4·7H2O</sub> g<sup>-1</sup><sub>s.tv.</sub> (melisa) (slike 15 – 19). Kao i kod DPPH metode, uočeno je da su se dodatkom PEG emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000) smanjile početne FRAP vrijednosti emulgiranih ekstrakata, u odnosu na početne FRAP vrijednosti biljnih ekstrakata, uz iznimku emulgiranih ekstrakata melise koja bilježi visoke početne FRAP vrijednosti. Proces emulgiranja tj. homogenizacija prilikom koje dolazi i do oslobađanja topline može biti uzrok smanjenoj antioksidacijskoj aktivnosti emulgiranih ekstrakata u odnosu na neemulgirane ekstrakte.

Rezultati antioksidacijske aktivnosti dobiveni FRAP metodom ne podudaraju se sa rezultatima antioksidacijske aktivnosti koji su dobiveni primjenom DPPH metode tijekom *in vitro* probave, zbog različitog utjecaja pH i različitih polifenolnih komponenti prisutnih u ekstraktima biljaka

koje utječu na sposobnost reduciranja pojedinog radikala. Na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata (slike 15-19) vidljiv je pad FRAP vrijednosti kod biljnih ekstrakata tijekom *in vitro* probave (usta>želudac>duodenum). FRAP vrijednosti izmjerene u duodenumu, za emulgirane biljne ekstrakte s dodatkom PEG1500, kretale su se u rasponu od 0,009  $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za mentu (slika 15) do 0,049  $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za lavandu (slika 19). Emulgirani biljni ekstrakti s dodatkom PEG6000 bilježe FRAP vrijednosti u duodenumu u rasponu od 0,048  $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za lavandu (slika 19) do 0,081  $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za mentu (slika 15) dok su za emulgirane biljne ekstrakte s dodatkom PEG20000 izmjerene FRAP vrijednosti u rasponu od 0,047  $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za lavandu (slika 19) do 0,086  $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{g}^{-1} \text{ s.tv.}$  za melisu (slika 18).

Uspoređujući FRAP vrijednosti prije (početna vrijednost) te nakon završene *in vitro* probave (vrijednost u duodenumu) moguće je primijetiti da su najveći stupanj očuvanja antioksidacijske aktivnosti, od emulgiranih uzoraka, imali uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom mente uz dodatak PEG6000 (slika 15), uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom majčine dušice uz dodatak PEG20000 (slika 16) te uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom lavande uz dodatak emulgatora PEG1500 (slika 19).

#### 4.3. POSTOTAK PREŽIVLJAVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA S ANTIOKSIDACIJSKOM AKTIVNOŠĆU

Biodostupnost se određuje kao omjer UF (DPPH, FRAP) u duodenumu (nakon završene *in vitro* probave) i početne (nulte) koncentracije (prije *in vitro* probave).

Tablica 4. Biodostupnost polifenolnih spojeva u biljnim ekstraktima i emulzijama ulje u vodenim biljnim ekstraktima

		MENTA	MAJČINA DUŠICA	KADULJA	MELISA	LAVANDA
UF	biljni ekstrakt	22,89 %	14,09 %	15,98 %	9,21 %	9,96 %
	PEG1500	29,12 %	12,21 %	8,74 %	9,48 %	5,29 %
	PEG6000	10,95 %	7,68 %	12,43 %	19,53 %	13,66 %
	PEG20000	8,25 %	9,32 %	7,23 %	9,05 %	12,53 %
DPPH	biljni ekstrakt	3,10 %	2,52 %	2,35 %	5,11 %	2,02 %
	PEG1500	4,55 %	8,76 %	3,64 %	2,56 %	11,37 %
	PEG6000	6,17 %	19,68 %	13,32 %	9,08 %	31,88 %
	PEG20000	1,16 %	8,09 %	3,60 %	4,27 %	1,85 %
FRAP	biljni ekstrakt	2,72 %	1,99 %	4,82 %	2,63 %	1,48 %
	PEG1500	3,90 %	6,82 %	7,25 %	7,86 %	16,35 %
	PEG6000	17,62 %	14,02 %	12,53 %	11,83 %	11,07 %
	PEG20000	12,26 %	16,04 %	14,01 %	7,85 %	9,55 %

Biodostupnost UF za biljne ekstrakte kretala se u rasponu od 9,21 % (melisa) do 22,89 % (menta) (tablica 4). Kod emulgiranih biljnih ekstrakata, biodostupnost UF kretala se u rasponu od 5,29 % za emulziju ulje u vodenom ekstraktu lavande uz dodatak PEG1500 do 29,12 % za emulziju ulje u vodenom ekstraktu mente uz dodatak istog emulgatora. Maksimalna



biodostupnost UF, uz dodatak PEG6000, za emulziju ulje u vodenom ekstraktu melise iznosila je 19,53 % dok je maksimalna biodostupnost UF, uz dodatak PEG20000, za emulziju ulje u vodenom ekstraktu lavande iznosila 12,53 %. Iz rezultata prikazanih u tablici 4 vidimo da je kod biljnih ekstrakata zabilježena najveća biodostupnost dok se biodostupnost emulgiranih biljnih ekstrakata smanjuje sa povećanjem molekulske mase emulgatora. Menta ima najveći postotak preživljavanja UF u svim uzorcima (čistim i emulgiranim) u usporedbi s drugim ispitivanim biljkama.

Uspoređujući rezultate očuvanja antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom biljnih ekstrakata i emulgiranih ekstrakata kroz probavu, vidljivo je da se emulgiranjem postigao željeni učinak povećanja biodostupnosti. Emulgiranjem se povećava stabilnost ekstrakata u uvjetima probave te veća dodirna površina prilikom apsorpcije emulgiranih ekstrakata u usporedbi sa neemulgiranim ekstraktima (Piementel-Moral i sur., 2018). Najveći postotak biodostupnosti zabilježen je za emulgirane biljne uzorke uz dodatak emulgatora PEG6000 (tablica 4).

Uspoređujući rezultate očuvanja antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom biljnih ekstrakata i emulgiranih ekstrakata kroz probavu, također je vidljivo da se emulgiranjem postigao željeni učinak povećanja biodostupnosti. Najveći postotak biodostupnosti zabilježen je za emulgirane biljne uzorke uz dodatak emulgatora PEG6000 (tablica 4) uz iznimku emulzije ulja u vodenom ekstraktu majčine dušice sa emulgatorom PEG20000 gdje je postignuta biodostupnost u iznosu od 16,04 %.

Razlika u koncentraciji UF u biljnim ekstraktima prije *in vitro* probave u odnosu na koncentraciju UF u biljnim ekstraktima nakon *in vitro* probave dokaz je niske biodostupnosti polifenola. Smanjenje količine ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH i FRAP metodama potvrđeno je u istraživanjima koje su proveli Jurinjak Tušek i sur. (2020) i Gutierrez-Grijalva (2017). Smatra se da je promjena pH tijekom probave glavni razlog niske biodostupnosti polifenola iz vodenih ekstrakata biljaka (Jurinjak Tušek i sur., 2020). Postotak preživljavanja polifenolnih komponenata tijekom *in vitro* probave određen kemijskim analizama (UF, DPPH i FRAP) pokazao je različite rezultate što se pripisuje razlici u pH vrijednosti biljnog ekstrakta kao i različitim spojevima prisutnim u biljnim ekstraktima. Više koncentracije emulgatora te veća molarna masa emulgatora mogući su razlog promjene u vrijednostima ukupne količine polifenola i antioksidacijske aktivnosti.

Velik je broj istraživanja koja su metodom inkapsulacije uspjela povećati biodostupnost polifenola. Većina istraživanja bavi se inkapsulacijom lipofilnih spojeva iako postoje indikacije da bi se mogla povećati biodostupnost i hidrofilnih spojeva (Piementel-Moral i sur., 2018). Inkapsulacijom u nanoemulzije, epigalokatehin galat, antioksidans prisutan u zelenom čaju, pokazuje duplo veću biodostupnost u odnosu na neinkapsulirane uzorke (Smith i sur., 2010). Također, inkapsulacijom ekstrakta biljke *Hibiscus sabdariffa* emulzijama ulje (maslinovo i suncokretovo) u vodenom ekstraktu biljke postignuta je veća biodostupnost u odnosu na neinkapsulirane uzorke (Piementel Moral i sur., 2018).

Osim lipida za inkapsulaciju polifenola koriste se ugljikohidrati čime se osigurava ciljano otpuštanje tijekom probave (Kardum i Gilbetić, 2018). Polifenoli inkapsulirani uz pomoć maltodekstrina pokazali su značajniji učinak u prevenciji kardiovaskularnih bolesti u usporedbi sa ne-inkapsuliranim ekstraktom (Jung i sur., 2013). Druga istraživanja potvrdila su uspješnost ove metode inkapsuliranjem kvercetina sa matriksom temeljenim na guar gumi čime se poboljšalo otpuštanje tijekom probave, i korištenjem pektin-hidroksipropilmetil celuloze za specifično otpuštanje u debelom crijevu kao i pektin čijom se upotrebom povećala biodostupnost polifenolnih spojeva (Kardum i Gilbetić, 2018). Istraživanjem autora Sarić (2020) uspješno su sačuvani polifenolni spojevi i druge biološki aktivne komponente inkapsulacijom vodenih biljnih ekstrakata mente, majčine dušice, kadulje, melise i lavande adsorpcijom na alginat.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Najviše vrijednosti UF u biljnim ekstraktima zabilježene su za melisu/matičnjak, zatim lavandu, kadulju, mentu i majčinu dušicu.
2. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodama za početne (nulte) koncentracije biljnih ekstrakata pokazuju kako najvišu antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom ima menta, a najmanju lavanda, dok najvišu antioksidacijsku aktivnost izmjerenu FRAP metodom ima melisa, a najmanju kadulja.
3. Početne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH i FRAP metodom niže su za emulgirane biljne ekstrakte u odnosu na biljne ekstrakte.
4. Tijekom *in vitro* probave dolazi do značajnog smanjenja vrijednosti ukupnih polifenola kao i antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH i FRAP metodama u biljnim ekstraktima i emulgiranim biljnim ekstraktima istraživanih biljaka u usporedbi sa njihovim početnim (nultim) vrijednostima.
5. Pripremanjem emulgiranih biljnih ekstrakata s emulgatorom polietilen glikol (PEG1500, PEG6000, PEG20000) nisu postignute veće vrijednosti preživljavanja UF u usporedbi sa biljnim ekstraktima. Najveća biodostupnost UF zabilježena je za emulziju ulje u vodenom ekstraktu mente, uz dodatak emulgatora PEG1500.
6. Pripremanjem emulgiranih biljnih ekstrakata s emulgatorom polietilen glikol (PEG1500, PEG6000, PEG20000) postignute su veće vrijednosti očuvanja antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH i FRAP metodama pri čemu je najveća biodostupnost zabilježena za emulziju ulje u vodenom ekstraktu lavande s emulgatorom PEG6000 mjereno DPPH metodom, dok je najveća biodostupnost mjerena FRAP metodom dobivena za emulziju ulje u vodenom ekstraktu mente s emulgatorom PEG6000.

## 6. LITERATURA

Aprotosoia, A.C., Raileanu, E., Trifan, A., Cioanca, O. (2013) The polyphenolic content of common lamiaceae species available as herbal tea products in romanian pharmacies. *Rev Med Chie Soc Med Nat Iasi*. **117**(1), 233-237.

Benkovic, M., Jurinjak Tusek, A., Valinger, D., Jurina, T., Belscak-Cvitanovic, A. (2016) Determination of correlations between electrical conductivity, dry matter, total polyphenolic content and antioxidant capacity of chamomile extracts (*Matricaria recutita* L.) // *Proceedings of 11th World Congress on Biotechnology and Biotech Industries Meet Henderson: Conference Series LLC*, str. 44-44 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Bojić, M., Maleš, Ž., Antolić, A., Babić, I., Tomičić, M. (2019) Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species. *Acta. Pharm.* **69**, 483-495.

Brglez-Mojzer, E., Knez Hrnčić, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. **21**(7), 901.

Britannica (2020) <<https://www.britannica.com/plant/Lamiaceae>>. Pristupljeno 26.07.2020.

Chen, J., Spear, S.K., Huddleston, J.G., Rogers, R.D. (2005) Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chem.* **7**, 64-82.

Cvetković, A.-M., Jurina, T., Valinger, D., Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Gajdoš Kljusurić, J. (2018) The estimation of kinetic parameters of the solid-liquid extraction process of the lavender flower (*Lavandula x hybrida* L.). *Croat. J. Food Sci. Technol.* **10** (1), 64-72.

El, S.N., Simsek, S. (2012) Food technological applications for optimal nutrition: an overview of opportunities for the food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **11**, 2-12.

Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Šimat, V., Smole Možina, S., & Katalinić, V. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: A correlation study. *Food Tech Biotech*, **52**, 119–127.

Gutierrez-Grijalva, E.P., Antunes-Ricardo, M., Acosta- , B.A., Gutierrez-Uribe, J.A., Basiolio Heredia, J. (2018) Cellular antioxidant activity and in vitro inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Frin.* **116**, 676-686.

Gutierrez-Grijalva, E.P., Angulo-Escalante, M.A., Leon-Felix, J., Basilio Heredia, J. (2017) Effect of In Vitro Digestion on the Total Antioxidant Capacity and Phenolic Content of 3 Species of Oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). *J Food Sci.* **82**(12), 2832-2839.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. izd., Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.

Jurinjak Tušek, A., Marić, L., Benković, M., Valinger, D., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J., (2020) In-vitro digestion of the bioactives originating from the Lamiaceae family herbal teas: A kinetic and PLS modeling study. *J Food Biochem.* **00**:e13233

Kardum, N., Gilbetić, M. (2018) Polyphenols and Their Interactions With Other Dietary Compounds: Implications for Human Health. *Adv Food Nutr Res.* **84**, 103-144.

Kralova, I., Sjoblom, J. (2009) Surfactants used in food industry: a review. *J Dispers Sci Technol.* **30**, 1363– 1383.

Kwon, Y., Vatter, D.A., Shetty, K. (2006) Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *J Clin Nutr.* **15**(1), 107-118.

Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*, Hinus, Zagreb, str. 305-312.

Marić, L. (2017) *Stabilnost vodenih ekstrakata samoniklog bilja tijekom simulacije probavnog sustava in vitro* (studentski rad za rektorovu nagradu, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J. (2007) Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *J Food Sci.* **72**(8), 109-124.

Mun S, Decker EA, McClements DJ. (2007) Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers. *Food Res Int* **40**, 770–81.

- Ngo, Y.L., Lau, C.H., Chua, L.S. (2018) Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem Toxicol.* **121**, 687-700.
- Ortega, N., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J., Motilva M.-J. (2011) Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chem.*, **124**(1), 65-71.
- Ozturk, B., McClements, D.J., Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Curr Opin Food Sci.* **7**, 1-6.
- Piementel-Moral, S., Teixeira, M.C., Fernandes, A.R., Arrae-Roman, D., Martinez-Ferez, A., Segura-Carretero, A., Souto, E.B. (2018) Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review. *Adv Colloid Interface Sci.* **260**, 85-94.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* **97**, 55-74.
- Ramasubramania Raja, R. (2012) Medicinally potential plants of Labiateae (Lamiaceae) family: An overview. *J. Med. Plant.* **6**(3), 203-213.
- Sarić, I. (2020) Usporedba bioraspoloživosti aktivnih tvari iz tekućih i mikroinkapsuliranih ekstraktata ljekovitog mediteranskog bilja (diplomski rad), Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Shishikura Y, Khokhar S, Murray BS. (2006) Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system. *J Agric Food Chem.* **54**, 1906–13.
- Sies, H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **91**, 31-38.
- Singh, H., Ye, A., Horne, D. (2009) Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog Lipid Res.* **48**(2), 92-100.
- Smith, A., Giunta, B., Bickford, P.C., Fountain, M., Tan, J., Shytle, R.D. (2010) Nanolipidic particles improve the bioavailability and  $\alpha$ -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Pharm.* **389**, 207-212.

Spencer, J. P. E. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **133**(10), 3255S-3261S.

Stagos., D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D. (2012) Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food. Chem. Toxicol.* **50**(11), 4115-4124.

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

Thompson, K., Hosking, H., Pederick, W., Singh, I., Santhakumar, A.B. (2017) The effect of anthocyanin supplementation in modulating platelet function in sedentary population: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Br. J. Nutr.* **118**, 368-374.

Trifković, K., Milašinović, N., Djordjević, V., Zdunić, G., Kalagasidis Krušić, M., Knežević-Jugović, Z., Šavikin, K., Nedović, V., Bugarski, B. (2015) Chitosan crosslinked microparticles with encapsulated polyphenols: Water sorption and release properties. *J Biomater. Appl.* **30**(5), 618-631.

Tzima, K., Brunton, N. P., Rai, D.K. (2018) Qualitative and Quantitative Analysis of Polyphenols in Lamiaceae Plants—A Review. *Plants.* **7**(2), 25.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A.D., Brantner, A.H. (2014) Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules.* **19**, 767-782.

Walstra P. (1993) Principles of emulsion formation. *Chem Eng Sci.* **48**:33351.

Walstra P. (2003). Physical chemistry of foods. Marcel Decker, New York

WHO guidelines on good herbal processing practices (GHPP) for herbal medicines (2017) World health organization, Geneva.

Wikipedia (2020) <<https://en.wikipedia.org/wiki/Lamiaceae>>. Pristupljeno 26.7.2020.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* **105**(3), 940-949.

Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Onistczyk, T., Combrzynski, M., Nowakowska, D., Matwijczuk, A. (2020) Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food. *Nutrients*. **12**, 10.3390/nu12051401.

Zgorka, G., Glowniak, K. (2001) Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J Pharm Biomed Anal*. **26**(1), 79-87



