

Trava iva (Teucrium montanum L.) - ekstrakcija bioaktivnih spojeva, inkapsulacija liposomima i formulacija funkcionalnih napitaka

Vugrinec, Kristina

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:159:481075>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020

Kristina Vugrinec

1230/PI

**TRAVA IVA (*Teucrium montanum*
L.) – EKSTRAKCIJA
BIOAKTIVNIH SPOJEVA,
INKAPSULACIJA LIPOSOMIMA I
FORMULACIJA
FUNKCIONALNIH NAPITAKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr.sc. Draženke Komes te uz pomoć asistentice Danijele Šeremet, mag. ing.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta „*Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda*“ (IP-2019-045879) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes na izdvojenom vremenu, iznimnoj susretljivosti i korisnim savjetima prilikom izrade ovog rada i cijelog fakultetskog obrazovanja.

Također, najljepše se zahvaljujem asistentici Danijeli Šeremet, mag. ing. na ljubaznosti, prenesenom znanju te velikoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Posebno hvala mojim roditeljima na svemu što su mi omogućili i što su me uvijek podržavali i ohrabivali da ustrajem na svom životnom putu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

TRAVA IVA (*Teucrium montanum* L.) – EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA, INKAPSULACIJA LIPOSOMIMA I FORMULACIJA FUNKCIONALNIH NAPITAKA

Kristina Vugrinec, 1230/PI

Sažetak: Iako biljni polifenoli posjeduju brojne biološke učinke, zbog niske stabilnosti i bioraspoloživosti njihova primjena u hrani je ograničena. Stoga posljednjih godina raste interes znanosti i prehrambene industrije za razvojem učinkovitih i pouzdanih tehnika ekstrakcije i inkapsulacije bioaktivnih spojeva. Cilj ovog rada bio je usporediti učinkovitost konvencionalnih tehnika ekstrakcije uključujući infuziju, dekociju i maceraciju s inovativnim tehnikama primjenom visokog hidrostatskog tlaka, subkritične vode i mikrovalova u ekstrakciji polifenolnih spojeva trave ive (*Teucrium montanum* L.) nakon čega je polifenolima najbogatiji ekstrakt inkapsuliran liposomima u svrhu formuliranja funkcionalnih napitaka kave. Dobivenim ekstraktima određeni su prinos ekstrakcije, udjel ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodama. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta provedena je liposomima s različitim omjerom ekstrakta i fosfolipida, 1:5, 1:10 i 1:20. Formiranim česticama ispitane su fizikalno-kemijske karakteristike te inkapsulacijska i antioksidacijska učinkovitost. Liposomi najboljih svojstava obloženi su slojem pektina ili alginata te je istima obogaćen napitak kave i tijekom četiri tjedna praćen je profil otpuštanja pojedinih polifenola. Konvencionalnim tehnikama dobiveni su ekstrakti s višim ekstrakcijskim prinosima u odnosu na inovativne, pri čemu je infuzijom ekstrahirano najviše ukupnih polifenola (41,13 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka), od čega je čak 35,93 % činio ehinakozid. Liposomi pripremljeni s većim udjelom fosfolipida (1:20), pokazali su najviši stupanj inkapsulacijske učinkovitosti za oba najzastupljenija polifenolna spoja trave ive, ehinakozid (68,27 %) i verbaskozid (80,60 %). Isti sustav pokazao je niske vrijednosti TBARS testa što ukazuje na visoki antioksidacijski potencijal inkapsuliranih spojeva u inhibiciji lipidne peroksidacije. Oblaganjem liposoma polimerima pospješilo se zadržavanje polifenolnih spojeva unutar strukture liposoma, pri čemu su liposomi obloženi alginatom pokazali sporiji profil otpuštanja polifenolnih spojeva u kavu u vremenskom periodu od četiri tjedna u odnosu na liposome obložene pektinom.

Ključne riječi: *ekstrakcija, funkcionalni napitci, liposomi, polifenolni spojevi, trava iva*

Rad sadrži: 85 stranica, 19 slika, 8 tablica, 151 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Danijela Šeremet, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo
2. Prof. dr. sc. Draženka Komes
3. Prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. Prof. dr. sc. Nada Vahčić

Datum obrane: 24. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

MOUNTAIN GERMANDER (*Teucrium montanum* L.) – EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS, ENCAPSULATION IN LIPOSOMES AND FORMULATION OF FUNCTIONAL DRINKS

Kristina Vugrinec, 1230/PI

Abstract: Although plant polyphenols possess numerous biological activities, due to their low stability and bioavailability, their application in food is limited. Therefore, in recent years, the interest of science and the food industry in the development of efficient and reliable techniques of extraction and encapsulation of bioactive compounds has been growing. The aim of this study was to compare the efficiency of conventional extraction techniques including infusion, decoction and maceration with innovative techniques using high hydrostatic pressure, subcritical water and microwaves in the extraction of polyphenols of mountain germander (*Teucrium montanum* L.) after which the polyphenol-rich extract was encapsulated with liposomes for the purpose of formulating functional coffee drinks. Prepared extracts were characterised by the determination of extraction yield, the content of total polyphenols and the antioxidant capacity (ABTS and DPPH assays). Encapsulation of the polyphenolic extract was performed with liposomes with different ratio of extract to phospholipids, 1: 5, 1:10 and 1:20. The physicochemical characteristics as well as encapsulation and antioxidant efficiency of the formed liposomes were examined. Liposomes with the best properties were coated with a layer of pectin or alginate and added to the coffee drink after which the polyphenol release profile was monitored for a period of four weeks. Conventional techniques resulted in higher extraction yields compared to innovative ones, with the most total polyphenols being extracted by infusion (41.13 mg EGA g⁻¹ DW), of which 35.93% was echinacoside. Liposomes prepared with a higher proportion of phospholipid (1:20) showed the highest degree of encapsulation efficiency for predominant polyphenolic compounds of mountain germander, echinacoside (68.27%) and verbascoside (80.60%). The same system showed low TBARS test values indicating a high antioxidant potential of encapsulated compounds in inhibiting lipid peroxidation. Coating liposomes with polymers enhanced the retention of polyphenols within the liposome structure, where alginate-coated liposomes showed a slower release profile of polyphenols in coffee over a four-week period compared to pectin-coated liposomes.

Keywords: *extraction, functional drinks, liposomes, mountain germander, polyphenols*

Thesis contains: 85 pages, 19 figures, 8 tables, 151 references

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. Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: Danijela Šeremet, MSc

Reviewers:

1. PhD. Ksenija Durgo, Full professor
2. PhD. Draženka Komes, Full professor
3. PhD. Ksenija Marković, Full professor
4. PhD. Nada Vahčić, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 24th, 2020

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. TRAVA IVA (<i>Teucrium montanum</i> L.)	3
2.2. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA	4
2.2.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije	5
2.2.2. Ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom.....	5
2.2.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom	7
2.2.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	8
2.3. INKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA	10
2.3.1. Inkapsulacija liposomima	12
2.3.2. Ionsko geliranje	13
2.3.3. Primjena tehnika inkapsulacije u proizvodnji funkcionalne hrane	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. MATERIJAL	17
3.1.1. Uzorci	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Aparatura i pribor	19
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Određivanje osnovnog kemijskog sastava trave ive	22
3.2.1.1. Određivanje udjela suhe tvari.....	22
3.2.1.2. Određivanje udjela prehrambenih vlakana.....	23
3.2.1.3. Određivanje udjela mineralnih tvari.....	24
3.2.1.4. Određivanje udjela proteina	25
3.2.1.5. Određivanje udjela masti.....	27
3.2.1.6. Određivanje udjela makro- i mikroelemenata	28
3.2.2. Određivanje udjela pojedinih pigmenata trave ive	29
3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnog klorofila.....	29
3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih karotenoida	30
3.2.2.3. Određivanje udjela ukupnih antocijana	31
3.2.3. Priprema polifenolnog ekstrakta trave ive	32
3.2.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije.....	32
3.2.3.2. Inovativne tehnike ekstrakcije.....	32
3.2.4. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta trave ive	33
3.2.4.1. Određivanje prinosa ekstrakcije	33
3.2.4.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola	33
3.2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	34

3.2.4.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	36
3.2.5. Priprema i karakterizacija liposoma s inkapsuliranim polifenolnim ekstraktom trave ive	37
3.2.5.1. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta trave ive liposomima	37
3.2.5.2. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika liposoma.....	37
3.2.5.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenolnih spojeva liposomima	38
3.2.5.4. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti inkapsuliranog ekstrakta trave ive tiobarbiturnom kiselinom (TBARS test).....	38
3.2.6. Inkapsulacija liposoma ionskim geliranjem	39
3.2.6.1. Određivanje morfoloških karakteristika liposoma obloženih alginatom i pektinom.....	39
3.2.6.2. Određivanje učinkovitosti zadržavanja polifenolnih spojeva u liposomima te u liposomima obloženim alginatom i pektinom.....	39
3.2.7. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	40
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	42
4.1. ODREĐIVANJE OSNOVNOG KEMIJSKOG SASTAVA TE MIKRO- I MAKROELEMENTA TRAVE IVE	43
4.1.1. Određivanje osnovnog kemijskog sastava.....	43
4.1.2. Određivanje udjela makro- i mikroelemenata	44
4.2. ODREĐIVANJE UDJELA POJEDINIPIGMENTA TRAVE IVE	45
4.2.1. Određivanje udjela ukupnog klorofila, ukupnih karotenoida i antocijana.....	45
4.3. KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA TRAVE IVE.....	47
4.3.1. Određivanje ekstrakcijskog prinosa.....	47
4.3.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola u ekstraktima.....	50
4.3.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ABTS i DPPH metodama	53
4.3.4. Određivanje udjela pojedinačnih polifenola u ekstraktima trave ive primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	54
4.4. KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA S INKAPSULIRANIM EKSTRAKTOM TRAVE IVE.....	56
4.4.1. Fizikalno- kemijska karakterizacija liposoma (određivanje veličine, indeksa polidisperzije i zeta potencijala liposoma)	56
4.4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR).....	58
4.4.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenolnih spojeva liposomima	61
4.4.4. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti inkapsuliranog ekstrakta trave ive tiobarbiturnom kiselinom (TBARS test)	63
4.4.5. Određivanje morfoloških karakteristika liposoma obloženih alginatom i pektinom	64
4.4.6. Određivanje učinkovitosti zadržavanja polifenolnih spojeva u liposomima te u liposomima obloženim alginatom i pektinom	65
5. ZAKLJUČCI.....	67
6. LITERATURA.....	68

1. UVOD

Različiti morfološki dijelovi biljaka, kao što su cvijet, list, stabljika i korijen bogati su izvori vrijednih bioaktivnih spojeva. Posljednjih godina sve je veće zanimanje za biljne polifenole koji predstavljaju veliku skupinu sekundarnih metabolita s brojnim biološkim učincima kao što su antioksidacijski, antimikrobni, protuupalni, hepatoprotektivni i antikancerogeni (Jovanović i sur., 2017a).

Razvoj pogodne i ekonomski prihvatljive tehnike ekstrakcije biološki aktivnih spojeva je vrlo izazovan zadatak budući da se polifenoli iz različitih biljaka značajno razlikuju u svojoj strukturi zbog čega nije moguće uspostaviti standardnu tehniku ekstrakcije kojom bi se izolirali svi ciljani spojevi iz svakog biljnog izvora (Bucić-Kojić i sur., 2011). Tijekom definiranja protokola ekstrakcije potrebno je uzeti u obzir nekoliko parametara, među kojima su najvažniji polaritet otapala, vrijeme i temperatura ekstrakcije (Rocchetti i sur., 2018). U literaturi je prikazano nekoliko tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva, od kojih je ekstrakcija kruto/tekuće najčešće korištena tehnika izdvajanja biljnih spojeva (Castro-López i sur., 2017). Međutim, danas je uobičajena podjela ekstrakcija na konvencionalne i inovativne tehnike (Barba i sur., 2017). Konvencionalne tehnike pripreme ekstrakata kao što su infuzija, dekokcija, maceracija i Soxhlet ekstrakcija koriste se za izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljnog matriksa pomoću odgovarajućeg otapala sa ili bez primjene topline. Iako su ove tehnike ekstrakcije vrlo jednostavne, imaju određene nedostatke poput slabe učinkovitosti, dugog vremena ekstrakcije i velike potrošnje otapala (Barba i sur., 2017). Zbog toga je u posljednje vrijeme sve češća primjena inovativnih, „zelenih“ tehnika ekstrakcije koje podrazumijevaju primjenu specifične tehnologije koja se temelji na unosu određene energije u matriks uzorka (Bursać-Kovačević i sur., 2018). Zbog navedenog, inovativne tehnike nude jedinstvenu učinkovitost ekstrakcije u pogledu smanjenja troškova i vremena ekstrakcije te povećanja prinosa i selektivnosti (Rocchetti i sur., 2018). Neke od inovativnih tehnika ekstrakcije koriste energiju mikrovalova, pulsirajuće električno polje, subkritičnu vodu i visoki hidrostatski tlak kako bi se ekstrahirao širok spektar bioaktivnih spojeva.

U pokušaju da udovolji zahtjevima potrošača prehrambena industrija nastoji također inkorporiranjem bioaktivnih spojeva obogatiti određene prehrambene proizvode (Bonilla-Lagos i sur., 2015). Međutim, postoji nekoliko ograničenja, kao što su slaba topljivost bioaktivnih spojeva u vodi te njihova niska stabilnost i bioraspoloživost što može ugroziti uspješnu ugradnju i funkcionalnost proizvoda. Zajednički interes znanstvenika i prehrambene

industrije usmjeren je prema razvoju tehnika kojima bi se ta ograničenja nadvladala. S tim u vezi, liposomi predstavljaju učinkovit sustav za inkapsulaciju, kako hidrofилnih, tako i lipofilnih bioaktivnih spojeva (Emami i sur., 2016). Riječ je o sferičnim česticama sastavljenima od fosfolipidnog dvosloja (ili više takvih slojeva) koji obuhvaća vodenu jezgru. Mogućnost proizvodnje liposoma primjenom sigurnih prirodnih sastojaka kao što su jaja ili soja, biokompatibilnost, mala veličina i sposobnost inkapsulacije širokog spektra bioaktivnih spojeva samo su neke od brojnih prednosti njihove primjene. Međutim, da bi inkapsulacija bila učinkovita, sustav mora biti dizajniran tako da osigurava otpuštanje dovoljno visoke koncentracije bioaktivnog spoja na željenom mjestu u organizmu. Nažalost, dugotrajna izloženost niskom pH u gastrointestinalnom traktu te prisutnost žučnih soli i lipaza destabiliziraju i oštećuju fosfolipidni dvosloj što uzrokuje problem s oralno primijenjenim liposomima. Da bi se osigurala veća stabilnost liposoma i produženo oslobađanje bioaktivnih spojeva u organizmu, liposomi se mogu dodatno obložiti polimerima kao što su alginat ili pektin, tehnikom ionskog geliranja (Đorđević i sur., 2014).

Cilj ovog rada je ispitati učinkovitost različitih tehnika ekstrakcije polifenolnih spojeva trave ive (*Teucrium montanum* L.) koji će se zatim inkapsulirati liposomima te koristiti u pripremi funkcionalnog napitka. U tu svrhu najprije će se odrediti kemijski sastav trave ive (određivanje udjela prehrambenih vlakana, mineralnih tvari, proteina i masti), a zatim nastaviti priprema ekstrakata. Ekstraktima dobivenim konvencionalnim (infuzija, dekokcija, maceracija) i inovativnim tehnikama ekstrakcije (ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija subkritičnom vodom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima) prvotno će se odrediti polifenolni profil, a zatim će se polifenolima najbogatiji ekstrakt inkapsulirati liposomima u sustave s različitim omjerima ekstrakta i fosfolipida. Pripremljenim liposomima odrediti će se fizikalno-kemijski parametri (veličina, zeta potencijal, indeks polidisperzije, FTIR spektar) te inkapsulacijska i antioksidacijska učinkovitost. Liposomi s najvišim stupnjem inkapsulacijske učinkovitosti dodatno će se obložiti alginskom i pektinom, odredit će im se morfološke karakteristike, a potom će se liofilizirati te dodati u uzorke kave kako bi se ispitaio učinak okolišnih uvjeta na stabilnost liposoma i profil otpuštanja bioaktivnih spojeva iz liposoma u kavu u vremenskom periodu od četiri tjedna.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRAVA IVA (*Teucrium montanum* L.)

Rod *Teucrium* uključuje oko 200 biljaka rasprostranjenih širom svijeta, od čega je gotovo 140 registrirano u mediteranskoj regiji (Wielgorskaya, 1995). Vrste roda *Teucrium* su aromatične i trajne zeljaste biljke ili polugrmovi, cjelovitih ili perastih listova smještenih na kratkoj peteljci. Cvjetovi su im položeni u pazušcima listova ili su skupljeni u vršne grozdaste ili klasaste cvatove. Zbog visokog udjela sekundarnih metabolita, biljke roda *Teucrium* smatraju se jednim od biološki najznačajnijih u porodici *Lamiaceae*. Ljekovite biljne vrste roda *Teucrium* vrlo su bogate fenolnim spojevima te se zbog svojih farmakoloških svojstava već stoljećima koriste u narodnoj medicini kao diuretici, antiseptici, antiflogistici, karminativi, dijaforetici, a također imaju i antireumatsko, antiseptičko i stimulativno djelovanje (Sundaresan i sur., 2006).

Trava iva (*Teucrium montanum* L.) (slika 1), poznata i pod nazivima dubačac mali i gorski cmilj, višegodišnja je biljka s vrlo razvijenim vretenastim korijenom. Stabljika je razgranata i drvenasta, visine 10 do 25 cm, dok su grane tanke i polegnute uz zemlju (Zlatić i sur., 2017). Listovi nemaju peteljku, eliptičnog su oblika i prema vrhu postupno suženi. Abaksijalna (donja) strana lista prekrivena je bijelim dlačicama, dok je adaksijalna (gornja) strana tamnozeleno boje s ili bez dlačica. Cvjetovi imaju kratku cvjetnu dršku te su smješteni na sjecištu lista i stabljike. Vjenčić je blijedo žute boje i sastoji se od pet režanja od kojih gornja dva čine gornju usnu, a donja tri grade donju usnu.



Slika 1. Trava iva (*Teucrium montanum* L.) (Anonymous 1, 2020)

Prirodno stanište trave ive su suha i topla mjesta. Uglavnom naseljava termofilne vapnene stijene, suhe planinske livade i rubove listopadnih i crnogoričnih šuma. Rasprostranjena je na području južne Europe, ali može se naći i u dijelovima zapadne i istočne Europe, Azije i sjevernim dijelovima Afrike. Cvate od lipnja do kolovoza kada se bere samo nadzemni dio biljke koji se potom suši. Vrlo je aromatična biljka izrazito gorkog okusa. Neki od bioaktivnih spojeva prethodno identificiranih u *T. montanum* uključuju fenolne kiseline, uglavnom gentizinsku, klorogensku i siringinsku kiselinu, flavonoide, seskviterpene, ali i kalij, magnezij i natrij (Čanadanović-Brunet i sur., 2006; Juranović-Cindrić i sur., 2013). Trava iva često se koristi kao diuretik te analgetsko sredstvo, a posjeduje i antibakterijsko, antifungalno, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje (Vuković i sur., 2007).

2.2. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je prvi korak u ispitivanju ljekovitih svojstava biljaka, koji uključuje izolaciju i karakterizaciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Najjednostavniji način pripreme biljnog ekstrakta je tehnikom ekstrakcije kruto/tekuće, u kojoj ekstrakcijski prinos najviše ovisi o svojstvima biljnog materijala i otapala te o temperaturi i trajanju ekstrakcije. Za ekstrakciju određenih bioaktivnih spojeva poput polifenola, mogu se koristiti različite ekstrakcijske tehnike, a troškovi, vrijeme i dostupnost opreme samo su neki od čimbenika koji utječu na izbor one najprikladnije. Prema radu Azmir i suradnika (2013) sve ekstrakcijske tehnike imaju zajedničke ciljeve, a to su:

- ekstrahirati točno određene bioaktivne spojeve iz složenog matriksa uzorka
- povećati selektivnost postupka
- prevesti bioaktivne spojeve u oblike prikladnije za identifikaciju i izdvajanje
- osigurati ponovljivost tehnike.

Tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva dijele se na konvencionalne kao što su infuzija, maceracija, dekokcija, kontinuirana vruća ekstrakcija (Soxhlet ekstrakcija), i na sve prisutnije, netoplinske tehnike ekstrakcije u koje spadaju ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija subkritičnom vodom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem i druge. S obzirom na raznolikost biljaka i bioaktivnih spojeva, samo odabir najpogodnije ekstrakcijske tehnike može rezultirati visoko kvalitetnim ekstraktima.

2.2.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

Bioaktivni spojevi iz biljnih materijala mogu se ekstrahirati pomoću raznih konvencionalnih tehnika ekstrakcije koje se temelje na ekstrakcijskoj snazi otapala i primjeni topline i/ili miješanja (Azmir i sur., 2013). Za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala najčešće se koriste polarna otapala, a najprikladnija za tu namjenu su voda te vodene mješavine etanola, metanola i etilnog acetata. Često korištene konvencionalne tehnike ekstrakcije su maceracija, infuzija i dekokcija.

Maceracija je tehnika ekstrakcije koja se tradicionalno koristi za pripremu balzama. Smatra se popularnim i jeftinim načinom dobivanja eteričnih ulja i biološki aktivnih spojeva, a provodi se u nekoliko koraka. U početku, osušeni biljni materijal se usitnjava kako bi se povećala površina čestica i ostvario bolji kontakt s otapalom. Zatim slijedi namakanje biljnog materijala u zatvorenom spremniku s otapalom, na sobnoj temperaturi najmanje dva dana, uz često miješanje. Na kraju se tekućina procijedi i filtrira.

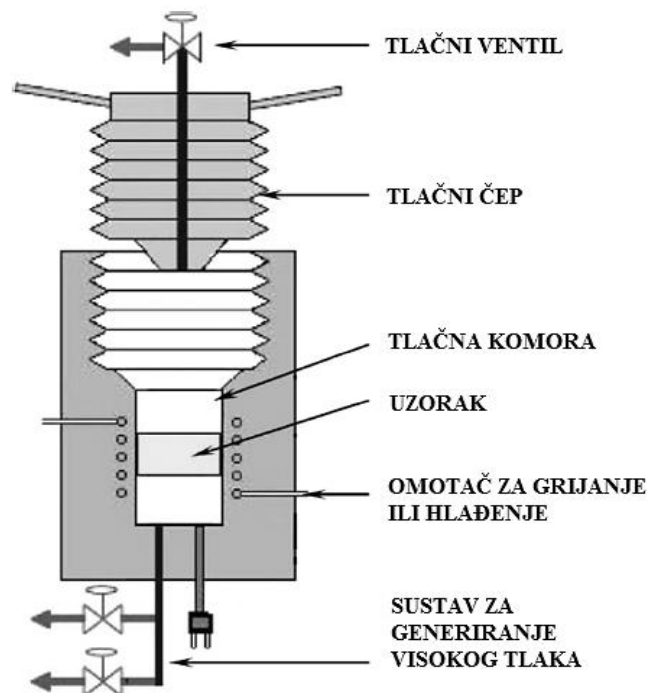
Infuzija i dekokcija koriste isti princip kao i maceracija. Kod obje tehnike uzorak se natapa u hladnoj ili prokuhanoj vodi, no vrijeme ekstrakcije za infuziju je kraće i uzorak se kuha u određenoj količini vode (npr. uzorak:voda 1:4) određeno vrijeme (Azwanida, 2015). Dekokcija je pogodna samo za ekstrakciju toplinski stabilnih spojeva iz tvrdog biljnog materijala kao što su kora ili korijen biljke.

Iako su ove tehnike ekstrakcije polifenola jednostavnije i lakše, ipak dugotrajne ekstrakcije pri visokim temperaturama povećavaju mogućnost degradacije bioaktivnih spojeva što dovodi do manjeg prinosa polifenola u ekstraktu. Također, spomenute tehnike mogu imati malu učinkovitost te predstavljati ekološki problem ukoliko se koriste organska otapala (Aires, 2017). Da bi se nadvladale takve prepreke predložene su nove, netoplinke tehnike ekstrakcije koje se smatraju „zelenima“ jer su ekološki prihvatljivije, sigurnije, efikasnije i brže (Garavand i sur., 2019).

2.2.2. Ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom

Ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom je netoplinška tehnika obrade uzorka koja je uspješno komercijalizirana u posljednjem desetljeću, a uključuje primjenu tlakova od 100 – 600 MPa. Ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom slijedi Le Chatelier princip, prema kojem kada u sustavu nastane poremećaj uzrokovan promjenom temperature ili koncentracije, sustav reagira na način da tu promjenu umanjuje i ponovno uspostavi ravnotežu (Shouqin i sur., 2005).

Drugim riječima, visoki hidrostatski tlak omogućava pokretanje raznih fenomena kao što su promjena dinamike reakcije ili prijelaz iz jedne faze u drugu, čime se reakcija pomiče u smjeru smanjenja volumena što rezultira povećanjem učinkovitosti ekstrakcije (Xi i sur., 2011). Parametri kao što su vrsta i volumen otapala, temperatura, tlak, trajanje ekstrakcije i broj ciklusa imaju značajan utjecaj na tijek ekstrakcije. Ipak, Jun i suradnici (2011) navode kako razina tlaka ima najvažniji utjecaj na prinos ekstrahiranih komponenti budući da povećanjem tlaka raste topljivost bioaktivnih spojeva. Također, u kasnijoj studiji Yan i Xi (2017) su izvijestili da tlak ima izravan mehanički učinak na organele i stanični sadržaj. Djelovanjem visokog tlaka stanična stijenka puca i u okolni medij se oslobađa visoka koncentracija bioaktivnih spojeva. Općenito je prihvaćeno da visoki hidrostatski tlak utječe na nekovalentne veze (vodikove veze, hidrofobne interakcije i van der Waalsove sile) (Huang i sur. 2013), što znači da su spojevi niske molekulske mase, kao što su mnogi bioaktivni spojevi (polifenoli), pigmenti i vitamini manje izloženi degradaciji. Slika 2 prikazuje dijelove uređaja za ekstrakciju visokim hidrostatskim tlakom, koji uključuju tlačni ventil, tlačnu komoru i tlačni čep. Za vrijeme ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom, uzorci su najprije podvrgnuti izostatskoj kompresiji, nakon čega se zadržavaju pri točno određenom tlaku neko vrijeme, a potom dekomprimiraju. Tijekom tretmana dolazi do porasta temperature od 3 °C za svaki porast tlaka od 100 MPa (Khan i sur., 2018).



Slika 2. Shematski prikaz uređaja za ekstrakciju visokim hidrostatskim tlakom (prilagođeno prema Khan i sur., 2018)

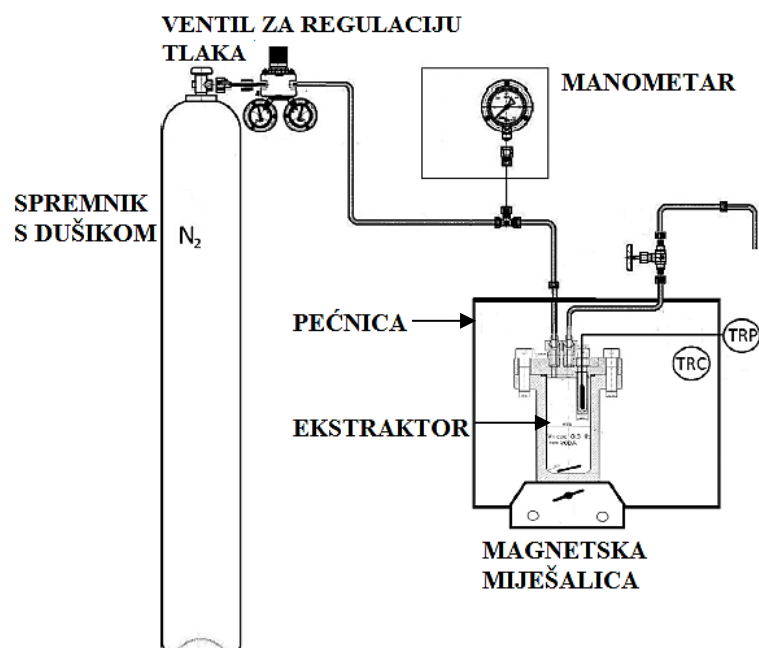
Prema Yan i Xi (2017) ekstrakcija bioaktivnih spojeva visokim hidrostatskim tlakom predstavlja dobru alternativu konvencionalnim tehnikama ekstrakcije s obzirom da traje kraće vrijeme, daje ekstrakte s većim prinosom bioaktivnih spojeva, zahtjeva manju potrošnju otapala te se provodi na sobnoj temperaturi čime je izbjegnuta toplinska razgradnja termolabilnih molekula.

2.2.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija subkritičnom vodom je ekološki prihvatljiva tehnika ekstrakcije koja se temelji na jedinstvenim svojstvima subkritične vode. Voda je u subkritičnom stanju u temperaturnom rasponu iznad temperature vrenja (100 °C) i ispod kritične temperature (374,2 °C), ali pri tlaku dovoljno visokom da ostane u tekućem stanju (Cvjetko-Bubalo i sur., 2015).

Poznavanje promjena u vodi s promjenama tlaka i temperature ključno je za razumijevanje ove tehnike ekstrakcije. Na sobnoj temperaturi voda je polarno otapalo čiji polaritet karakterizira dielektrična konstanta od 80 što ju čini prikladnom za ekstrakciju vrlo polarnih spojeva. Kad se temperatura povisi na 250 °C, a tlak iznosi 25 bara, dielektrična konstanta vode smanji se na 25, što je slično vrijednostima dielektričnih konstanti organskih otapala metanola ($\epsilon = 33$) i etanola ($\epsilon = 24$) na 25 °C (Zhang i sur., 2019). Naglim padom dielektrične konstante smanjuje se polaritet vode čime ona postaje pogodna za ekstrakciju nepolarnih spojeva. U subkritičnom stanju, osim polarnosti, značajno su sniženi i površinska napetost, viskoznost i gustoća vode, što rezultira intenzivnim vlaženjem biljnog materijala i bržim otapanjem ciljanih spojeva u vodi (Jokić i sur., 2018). Za vrijeme ekstrakcije subkritičnom vodom prijenos ciljanih spojeva iz matriksa uzorka u vodu odvija se postupcima difuzije i konvekcije (Cvjetko-Bubalo i sur., 2015). Subkritična voda pokazuje veću difuzivnost u odnosu na vodu sobne temperature, što rezultira bržom ekstrakcijom spojeva. Postupnim povećanjem temperature moguće je nadvladati interakcije između ciljanih spojeva i matriksa uzorka koje uključuju kombinaciju van der Waalsovih sila, vodikovih veza i dipolnih interakcija, dok povišeni tlak omogućava prodiranje vode u pore uzorka, što pri atmosferskom tlaku ne bi bilo moguće postići (Zhang i sur., 2019).

Ekstrakcija subkritičnom vodom može se izvesti u statičkom i dinamičkom načinu rada. Za razliku od dinamičkog, statički sustav nema pumpu zbog čega je zadržavanje subkritične vode u sustavu duže što može rezultirati degradacijom termolabilnih bioaktivnih spojeva. Glavna prednost statičkog sustava (slika 3) je ta što je jeftiniji (Jokić i sur., 2018).



Slika 3. Shematski prikaz statičkog sustava ekstrakcije subkritičnom vodom (prilagođeno prema Jokić i sur., 2018).

U usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, ekstrakcija subkritičnom vodom nudi niz prednosti koje uključuju veće ekstrakcijske prinose, brže vrijeme ekstrakcije te upotrebu jeftinog i lako dostupnog otapala – vode (Zakaria i Kamal, 2015).

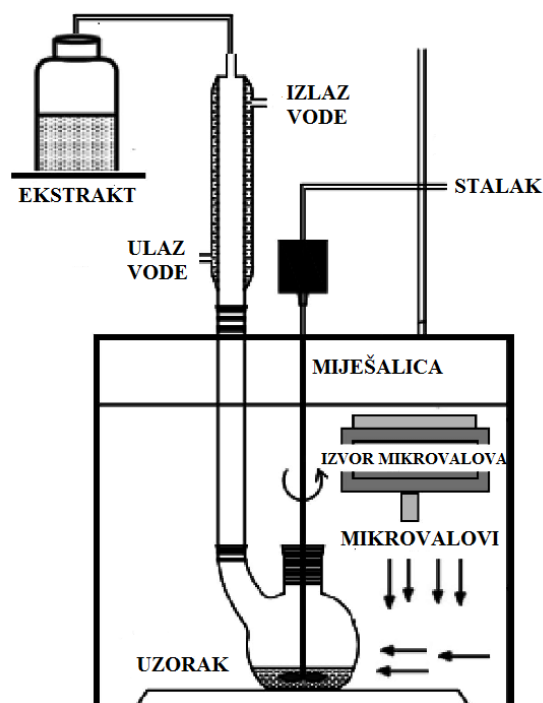
2.2.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su neionizirajuće elektromagnetsko zračenje frekvencije od 300 MHz do 300 GHz (Shahid i sur., 2015), koji su u elektromagnetskom spektru smješteni između rendgenskih i infracrvenih zraka. Sastoje se od električnog i magnetskog polja koja su međusobno okomita, a zagrijavanje medija odvija se pomoću dva istodobna mehanizma, ionske provodljivosti i dipolarne rotacije. Ionska provodljivost odnosi se na elektroforetsku migraciju iona pod utjecajem električnog polja koje se mijenja. Otpor koji nastaje uslijed migracije stvara trenje zbog čega se otopina zagrijava. Dipolarna rotacija označava usklađivanje molekula dipola s brzo promjenjivim električnim poljem. Električna komponenta vala mijenja se $4,9 \times 10^4$ puta u sekundi (Zuloaga i sur., 1999). Svaki put kad se molekule otapala pokušavaju uskladiti s električnim poljem da bi se zadržale u istoj fazi, električna komponenta vala se mijenja tako velikom brzinom da se molekule ne uspijevaju ponovo vratiti u početni položaj i započinju vibrirati što trenjem stvara toplinu. Mehanizam jasno pokazuje da će se samo dielektrični materijal ili otapalo s trajnim dipolom zagrijati. Učinkovitost zagrijavanja različitih

otapala podvrgnutih mikrovalnom zračenju ovisit će o faktoru raspršivanja koji predstavlja sposobnost otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i prenosi je kao toplinu na okolne molekule. Otapala s visokom dielektričnom konstantom i visokim faktorom raspršivanja zagrijavaju se brže.

Tijekom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima dolazi do pucanja vodikovih veza i migracije otopljenih iona, što rezultira povećanim prodorom otapala u matricu uzorka i olakšanom ekstrakcijom ciljanih spojeva. Također, zbog značajnog tlaka razvijenog unutar matrice uzorka dolazi do porasta njegove poroznosti što rezultira većom difuzijom otapala (Kubrakova i Toropchenova, 2008). Za razliku od konvencionalnih tehnika ekstrakcije, tijekom mikrovalne ekstrakcije cijeli uzorak se zagrijava istovremeno. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je ekonomična i ekološki sigurna tehnika ekstrakcije (Rezaei i sur., 2013).

Postoje dva tipa uređaja za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, ovisno o tome je li sustav vođen u otvorenoj ili zatvorenoj posudi. Zatvoreni sustavi koriste se za ekstrakciju ciljanih spojeva pri višim uvjetima temperature i tlaka, dok se otvoreni sustavi koriste za ekstrakciju provedenu u uvjetima atmosferskog tlaka (Shahid i sur., 2015). Karakterističan uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima prikazan je na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (prilagođeno prema Shahid i sur., 2015).

2.3. INKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Bioaktivni spojevi pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje, ali su kemijski nestabilni i podložni razgradnji, posebice kada su izloženi kisiku, svjetlu, vlazi i toplini (Ariyaratna i Karunaratne, 2015). Zbog niske bioraspoloživosti, slabe topljivosti i brzog otpuštanja u gastrointestinalnom traktu, primjena bioaktivnih spojeva u njihovom izvornom obliku je ograničena. Stoga, raste interes prehrambene i farmaceutske industrije za upotrebom neke od tehnika inkapsulacije. Inkapsulacija je postupak u kojem se bioaktivne tvari ugrađuju unutar, odnosno prevlače sustavom nosača kako bi se formirale čestice ili kapsule (Islam Shishir i sur., 2018). Komponenta koja se inkapsulira (aktivna tvar) naziva se jezgra, ispun ili unutarnja faza, dok je materijal za inkapsulaciju (nosač) poznat kao membrana, kapsula, matrica ili vanjska faza (Devi i sur., 2017). Prema morfologiji, čestice se dijele na monojezgrene, višejezgrene i matrične u kojima je bioaktivni spoj raspršen u obliku sitnih kapljica unutar nosača (Ye i sur., 2018). Tehnikama mikroinkapsulacije dobivaju se mikročestice veličine 1- 1000 μm , dok se nanoinkapsulacijom formiraju čestice veličine 1 do nekoliko stotina nm. Budući da smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja površine, nanočestice imaju veću topljivost u usporedbi s mikročesticama što omogućava brže otpuštanje bioaktivnih spojeva u okolinu (de Souza Simões i sur., 2017).

Izbor materijala za inkapsulaciju temelji se na poznavanju fizikalno-kemijskih i reoloških svojstava nosača i spojeva koji se inkapsuliraju. Zbog primjene mikročestica u prehrambenim proizvodima, sa stajališta zdravlja i sigurnosti, materijal za inkapsulaciju mora imati GRAS status, dok s aspekta funkcionalnosti treba biti dobar emulgator i posjedovati dobra svojstva otapanja i formiranja matrice. Prema Ye i suradnicima (2018), mehanizmi koji stoje iza tvorbe strukture matrice mogu se podijeliti u četiri kategorije na temelju vrste inkapsulacijskog materijala. U slučaju korištenja polimera kao nosača, kao što su pektin, alginat, agar, dekstran i drugi, polimerni lanci međusobno se povezuju kovalentnim vezama, za razliku od lipida koji se stabiliziraju hidrofobnim i van der Waalsovima interakcijama. Proteini, kao što su izolati proteina sirutke i kazein, drže se zajedno zahvaljujući hidrofobnim interakcijama i kovalentnim disulfidnim umrežavanjem, dok se guste matrice metalnih alkoksida i silicijevog dioksida formiraju hidrolizom i polikondenzacijom. Stoga, prilikom odabira materijala za inkapsulaciju potrebno je poznavati njegovu molekularnu masu i naboj te topljivost i kemijsku stabilnost kako bi se osigurao visoki stupanj inkapsulacijske učinkovitosti.

Također, za stvaranje mikro- i nanočestica preporučuju se razne tehnike inkapsulacije, međutim niti jedna od njih se ne može smatrati univerzalno primjenjivom za inkapsulaciju svih

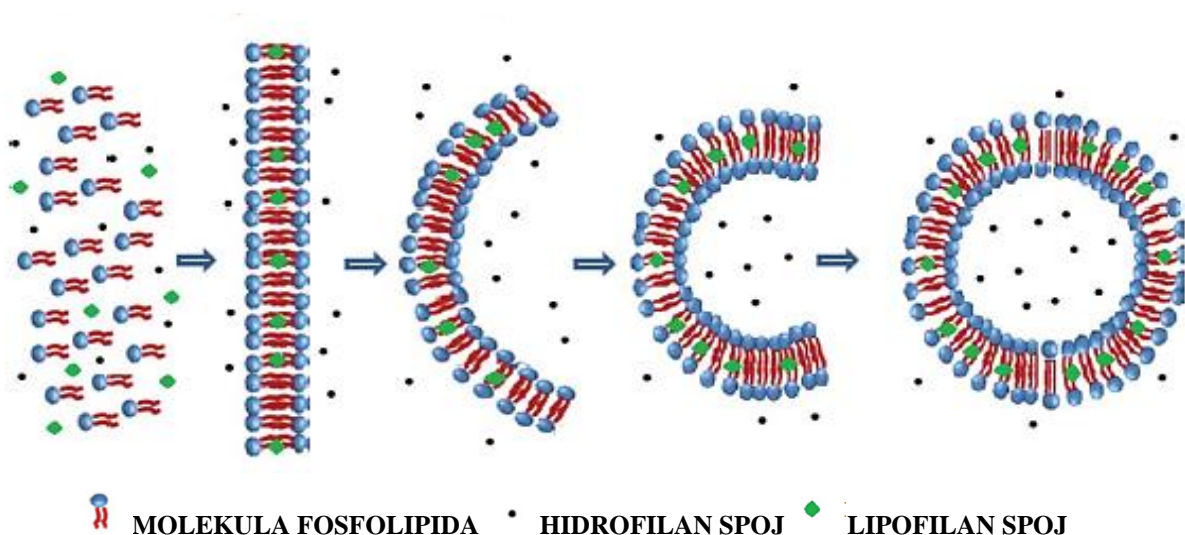
polifenolnih spojeva zbog činjenice da svaki spoj ima različite karakteristike (Ray i sur., 2016). Nekoliko tehnika je razvijeno i primijenjeno za inkapsulaciju polifenolnih spojeva, uključujući ionsko geliranje, elektroispredanje, inkapsulaciju liposomima, emulzifikaciju i sušenje raspršivanjem (tablica 1).

Tablica 1. Primjeri inkapsulacijskih tehnika korištenih za inkapsulaciju biljnih polifenola

INKAPSULACIJSKA TEHNIKA	IZVOR POLIFENOLA	BIOAKTIVNI SPOJEVI	REFERENCA
Ionsko geliranje	list maslačka (<i>Taraxacum officinale</i> L.)	hidroksicimetne kiseline (klorogenska, kaftarinska, čikorinska, kafeinska)	Bušić i sur., 2018
	stevija (<i>Stevia rebaudiana</i> L.)	flavonoidi (katehin, luteolin)	Arriola i sur., 2018
Elektroispredanje	zeleni čaj	katehini	Bhushani i sur., 2017
	višnja (<i>Prunus cerasus</i> L.)	ukupni polifenoli (flavonoidi)	Isik i sur., 2018
Inkapsulacija liposomima	kurkuma (<i>Curcum longa</i> L.)	kurkumin	Hasan i sur., 2019
	zeleni čaj	katehin, epigalokatehin galat	Rashidinejad i sur., 2016
Emulzifikacija	list masline (<i>Olea europaea</i> L.)	oleuropein	Robert i sur., 2018
	rogač (<i>Ceratonia siliqua</i> L.)	ukupni polifenoli	Wang i sur., 2020
Sušenje raspršivanjem	crveni radič (<i>Chicorium intibus</i> L.) crveni kupus (<i>Brassica oleracea</i> L.)	hidroksicimetne kiseline	Zanoni i sur., 2020
	list masline (<i>Olea europaea</i> L.)	oleuropein, verbaskozid, oleurozid	González i sur., 2019

2.3.1. Inkapsulacija liposomima

Liposomi su male čestice sferičnog oblika građene od fosfolipida i kolesterola. Molekule fosfolipida sadrže polarnu, hidrofilnu glavu koja se sastoji od kolina ($C_5H_{14}NO^+$), fosfata (PO_4^{3-}) i glicerola ($C_3H_8O_3$) i nepolarni, lipofilni rep izgrađen od dugog lanca ugljikovodika, to jest masne kiseline. Interakcija između hidrofilnih glava i lipofilnih ugljikovodičnih repova omogućava stvaranje fosfolipidnog dvosloja, koji je sastavni dio staničnih membrana. Kada su lipidi izloženi vodenom okruženju, javljaju se van der Waalsove sile između lanaca ugljikovodika te vodikove veze između molekula vode i polarnih grupa fosfolipida, fosfata i karbonila (Islam Shishir i sur., 2019). Unošenjem dovoljne energije u agregirane fosfolipide, uklanja se nepovoljna interakcija između masnih kiselina i vode, zbog čega dolazi do savijanja fosfolipidnog dvosloja u sferičnu strukturu liposoma (slika 5). Također, kolesterol je ključna komponenta liposoma jer se hidroksilna skupina kolesterola vodikovim vezama veže na karbonilnu skupinu fosfolipida čime se smanjuje fluidnost membrane, povećava kohezija lipida te poboljšava liposomska stabilnost. Stoga, struktura liposoma osim što ovisi o interakcijama lipidnog dvosloja i vodenog medija, određena je i prirodom svojih gradivnih komponenti (Nogueira i sur., 2015).



Slika 5. Shematski prikaz formiranja liposoma (prilagođeno prema Emami i sur., 2016)

Veličina liposoma može varirati u rasponu od 20 nm do nekoliko μm u promjeru, s debljinom membrane oko 4–5 nm. Prema veličini i broju fosfolipidnih dvosloja, liposomi se klasificiraju na male jednolamelarne, koje sadrže jedan lipidni dvosloj (veličine $< 0,1 \mu m$),

velike jednodamelarne (veličine 0,1-1 μm) i višeslojne liposome, koji sadrže nekoliko lipidnih dvosloja (veličine $> 1\mu\text{m}$) (Taylor i sur., 2005). Budući da liposomi sadrže vodenu jezgru i lipidnu fazu, istovremeno mogu inkapsulirati i lipofilne i hidrofilne spojeve (Tsai i Rizvi, 2017). Lipofilni spojevi ugrađuju se u regiju unutar lipidnog dvosloja zbog čega inkapsulacija ovisi o duljini i zbijenosti ugljikovodičnih lanaca unutar dvosloja. S druge strane, hidrofilni spojevi pokazuju tendenciju ugradnje u vodenu jezgru liposoma. Zbog većeg udjela vodene faze jednodamelarni liposomi su pogodniji za inkapsulaciju hidrofilnih spojeva, dok su višeslojni liposomi zbog visokog udjela lipida povoljniji za inkapsulaciju lipofilnih spojeva (Immordino i sur., 2006).

Za formiranje liposoma koriste se različiti lipidi, uključujući fosfatidilkolin, sfingomijelin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol i sojin lecitin (Gasa-Falcon i sur., 2020). Postoji mnogo različitih tehnika za pripremu liposoma, a izbor one najprikladnije ovisi o nekoliko čimbenika:

- fizikalno-kemijskim karakteristikama liposoma i bioaktivne tvari
- koncentraciji bioaktivne tvari
- vrsti medija u kojem su liposomi pripremljeni
- procesima koji se odvijaju tijekom formiranja liposoma
- troškovima i primjenjivosti tehnike za industrijsku proizvodnju u kliničke svrhe (Bozzuto i Molinari, 2015).

Tehnike za pripremu liposoma zasnivaju se na primjeni organskih otapala, poput tehnike hidratacije tankog lipidnog filma, ubrizgavanja etanola, formiranja liposoma mehaničkim miješanjem te tehnikom isparavanja reverznih faza. Međutim, ove tehnike rezultiraju liposomima s širokom raspodjelom veličine čestica. Iz tog razloga je u posljednje vrijeme sve češća integracija dodatnog postupka poput ekstruzije, ultrazvuka ili mikrofluidizacije u konvencionalne tehnike s ciljem smanjenja veličine liposoma kao i poboljšanja učinkovitosti inkapsulacije i profila otpuštanja bioaktivnih spojeva (Shah i sur., 2017).

2.3.2. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje je fizikalno-kemijska tehnika inkapsulacije tvari koja se smatra relativno blagom i pogodnom za inkapsulaciju većine bioaktivnih spojeva, ali zbog porozne strukture hidrogel čestica otežano je zadržavanje nekih topljivih komponenti (Cutrim i sur., 2019). Ionsko geliranje može se provesti postupcima atomizacije, ekstruzije, koekstruzije ili elektrostatičkim taloženjem (Maestrelli i sur., 2008). Obično se vodena polimerna otopina, u

kojoj se otopi bioaktivni spoj koji se inkapsulira, istiskuje kroz iglu u ionsku otopinu pod stalnim miješanjem. Nastale kapljice u kontaktu s otopinom iona suprotnog naboja reagiraju i formiraju sferične hidrogel čestice. Mehanizam ionskog geliranja opisan je „egg box“ modelom u kojem do geliranja dolazi uslijed interakcije karboksilne grupe polisaharida, posebno sekvence guluronske kiseline u slučaju alginata, s kalcijevim ionima pri pH koji prelazi pKa vrijednost polisaharida (Silverio i sur., 2018). Promjena pH, djelovanje osmotske sile i enzimska razgradnja samo su neki od faktora koji utječu na oslobađanje inkapsulirane tvari u okolinu. Ionsko geliranje je jednostavna, jeftina i brza tehnika koja se odvija pri blagim temperaturama i ne zahtijeva primjenu organskih otapala (Schoubben i sur., 2010). Međutim, zbog difuzijskog mehanizma može doći do heterogene gelacije čestica, budući da se površinsko geliranje često događa prije geliranja u jezgri koja zbog toga ostaje mekana (Kurozawa i Hubinger, 2017).

2.3.3. Primjena tehnika inkapsulacije u proizvodnji funkcionalne hrane

Prehrambena industrija nastoji razviti prehrambene proizvode koji udovoljavaju potrebama potrošača za zdravim načinom života. U tom kontekstu, funkcionalna hrana ima značajnu ulogu, a prvi puta se spominje 1984. godine u Japanu. Da bi se hrana mogla smatrati funkcionalnom, pored energetske, mora imati i zdravstvenu ulogu i pokazivati pozitivne zdravstvene učinke na ciljne funkcije u organizmu. Stoga su razlozi razvoja koncepta funkcionalne hrane višestruki: poboljšanje općeg stanja organizma, smanjenje rizika od pojave nekih bolesti, kao i primjena u liječenju određenih bolesti (Bigliardi i Galati, 2013).

Tržište funkcionalne hrane posljednjih je godina jedno od najbrže rastućih sektora na svjetskom tržištu hrane i predviđa se da će se povećati sa oko 300 milijardi američkih dolara (USD) u 2017. na preko 440 milijardi USD u 2022. godini. Sjedinjene Američke Države su najveće tržište funkcionalne hrane u svijetu, a očekuje se stalni rast od 8 % godišnje (Jędrusek-Golińska i sur., 2020). Funkcionalna hrana prisutna je u gotovo svim kategorijama hrane, a najzastupljenija je na tržištu mliječnih proizvoda, konditorskih i pekarskih proizvoda te bezalkoholnih pića. Funkcionalna hrana može se podijeliti u četiri skupine:

- Nemodificirana i neobrađena hrana – najjednostavnija funkcionalna hrana koja prirodno sadrži nutritivne komponente. Obuhvaća voće, povrće, začine i začinsko bilje.
- Obogaćeni proizvodi – sadrže povećane količine postojećih nutrijenata koji su već prirodno prisutni u hrani ili su im dodani novi nutrijenti koji se inače ne nalaze u tom

proizvodu ili nisu uobičajeno prisutni u velikoj količini. Uključuje proizvode poput voćnih sokova obogaćenih vitaminom C i mlijeka obogaćenog vitaminom D te probiotike i prebiotike.

- Izmijenjeni proizvodi – proizvodi u kojima je provedena zamjena postojeće komponente s nutrijentima koji imaju pozitivan učinak na zdravlje, npr. proizvodi sa smanjenim udjelom masti.
- Poboļšani proizvodi – jedna ili više komponenta je prirodno obogaćena kroz specijalne uvjete uzgoja biljaka i životinja kao što su primjerice kukuruz s visokim udjelom lizina i jaja s povećanim udjelom omega-3 masnih kiselina (Čalić i sur., 2011, Kaur i Singh, 2017).

Nedavni trendovi pokazali su da su bioaktivni spojevi biljnoga podrijetla poput polifenola, vitamina i karotenoida zanimljive komponente za razvoj mnogih funkcionalnih proizvoda, s obzirom da imaju značajnu ulogu u poboljšanju zdravstvenog stanja i minimiziranju rizika od pojave bolesti. Međutim, proizvodnju funkcionalne hrane potrebno je prilagoditi jer samo mali dio bioaktivnih molekula ostaje na raspolaganju nakon oralne primjene, obično zbog nedovoljnog zadržavanja u želucu, male propusnosti i/ili topljivosti u crijevima, kao i zbog nepovoljnih uvjeta tijekom proizvodnje hrane i u gastrointestinalnom traktu (Morais i sur., 2018). Upravo iz tih razloga, veliki je izazov osigurati stabilnost i aktivnost funkcionalnih sastojaka hrane tijekom proizvodnje i konzumacije jer učinkovitost funkcionalnih proizvoda u sprječavanju bolesti izravno ovisi o očuvanju stabilnosti, bioaktivnosti i bioraspoloživosti bioaktivnih spojeva (Betoret i sur., 2016). Iz tog razloga, proizvođači prehrambenih proizvoda moraju uzeti u obzir brojne varijable prilikom razvoja funkcionalnih proizvoda, uključujući senzorsku prihvatljivost, stabilnost, cijenu, funkcionalna svojstva i praktičnost. U tu svrhu, posljednjih je nekoliko godina sve češća primjena pojedinih tehnika inkapsulacije bioaktivnih spojeva u proizvodnji funkcionalnih proizvoda. Pregledom dostupne literature, u tablici 2 dani su primjeri inkapsuliranih bioaktivnih spojeva koji su implementirani u razne proizvode s ciljem proizvodnje funkcionalnih proizvoda.

Tablica 2. Primjeri inkapsuliranih bioaktivnih spojeva i proizvoda u koje su ti bioaktivni spojevi implementirani

BIOAKTIVNI SPOJ	TEHNIKA INKAPSULACIJE	PROIZVOD U KOJI JE IMPLEMENTIRAN BIOAKTIVNI SPOJ	REFERENCA
Kvercetin	Inkapsulacija liposomima	Permeat slatke sirutke	Frenzel i sur., 2015
Polifenolni ekstrakt crne murve (<i>Morus nigra</i> L.)	Inkapsulacija liposomima	Tamna čokolada	Gültekin- Özgüyen i sur., 2016
Polifenolni ekstrakt koncentrata višnje	Inkapsulacija liposomima	Jogurt	Akgün i sur., 2020
Ekstrakt kurkume	Inkapsulacija liposomima	Sok od jabuke, sok od marelice, mlijeko	Karimi i sur., 2019
Katehin i epigalokatehin galat	Inkapsulacija liposomima	Nemasni tvrdi sir	Rashidinejad i sur., 2014
Polifenolni ekstrakt ljuske kakaovca	Inkapsulacija liposomima	Tekući jogurt	Altin i sur., 2018
Vitamini C i E	Inkapsulacija liposomima	Sok od naranče	Marsanasco i sur., 2011
Omega-3, omega-6, tokoferol	Inkapsulacija liposomima	Sok od naranče	Marsanasco i sur., 2015
Polifenolni ekstrakt hibiskusa (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Ionsko geliranje	Žele bomboni	De Moura i sur., 2018
Polifenolni ekstrakt hibiskusa (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Ionsko geliranje	Jogurt	De Moura i sur., 2019
Probiotička baterija <i>L. acidophilus</i>	Emulzifikacija, ionsko geliranje	Svježi sir	Santacruz i Castro, 2018
Ulje timijana (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	Emulzifikacija, ionsko geliranje	Govedi burger	Ghaderi-Ghahfarokhi i sur., 2016
Vitamin C	Emulzifikacija	Piće zaslađeno stevijom	Kheynoor i sur., 2018
Likopen	Sušenje raspršivanjem	Kolač	Rocha i sur., 2012
Pigment betacijanin	Sušenje raspršivanjem	Jogurt, bezalkoholni sok	Obón i sur., 2009
Omega-3 masne kiseline	Sušenje raspršivanjem	Kolač	Santhanam i sur. 2014
Ekstrakt biljke jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflor</i> L.)	Sušenje raspršivanjem	Svježe kobasice	Baldin i sur., 2016
Probiotička bakterija <i>L. brevis</i>	Elektroispredanje	Jogurt, sok od naranče, sok od jabuke	Mohaisen i sur., 2019

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Za provođenje eksperimentalnog dijela rada korišteni su osušeni nadzemni dijelovi biljke trave ive (*Teucrium montanum* L.) podrijetlom iz Republike Hrvatske (Travar M.B., Bjelovar). Biljni materijal je za pripremu ekstrakata usitnjen u električnom mlinu i prosijan na željenu veličinu čestica ($< 450 \mu\text{m}$). Uzorak je pohranjen u papirnatu vrećicu u tami na sobnoj temperaturi.

Polifenolni ekstrakti trave ive pripremljeni su konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije. Ekstrakt s najvišim udjelom polifenolnih spojeva inkapsuliran je liposomima. Liposomi s najvišom inkapsulacijskom učinkovitosti dodatno su obloženi natrijevom soli alginske kiseline iz smeđih algi niske viskoznosti (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) i niskometiliranim pektinom (Cargill, Zagreb, Hrvatska) tehnikom ionskog geliranja. Dobivene čestice su liofilizirane te dodane u prethodno pripremljene napitke kave (Franck d.o.o., Zagreb, Hrvatska).

3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) čistoće.

Određivanje topljivih i netopljivih vlakana

- Etanol 96 %-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 78 %-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Enzimski set za određivanje vlakana, Megazyme (Wicklów, Irska)
- Trizma base, 0,75 M otopina, Megazyme (Wicklów, Irska)
- Octena kiselina, Kefo d.o.o (Sisak, Hrvatska)
- Celite 545, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Određivanje udjela proteina

- Sumporna kiselina 96 %-tna, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Borna kiselina, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kjeldahl-ove tablete, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Njemačka)
- Indikator metil-crveno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (37 %-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela pojedinih pigmenata

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- *n*-heksan, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina 37 %-tna, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogensulfat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom

- Etanol 96 %-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboskilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Inkapsulacija i karakterizacija liposoma i hidrogel čestica

- Etanol 96 %-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kloroform, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- Tiobarbiturna kiselina, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Perklorna kiselina Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Trikloroetena kiselina Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Niskometilirani pektin, Cargill (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev alginat, Sigma Aldric (St. Louis, SAD)
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Mljevena kava, Franck d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

HPLC analiza

- Redestilirana voda, AQUA pro injectione (Zagreb, Hrvatska)
- Mravlja kiselina 99 %-tna, Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)
- Acetonitril, Fischer Scientific (Waltham, SAD)

3.1.3. Aparatura i pribor

Određivanje kemijskog sastava

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železnik, Slovenija)
- Aluminijske posudice s poklopcima, eksikator
- Boca za odsisavanje
- Gumeni prsten, izvor vakuuma
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic, Elma (Njemačka)
- Laboratorijske boce
- Staklena menzura
- Sinter lončići, špatula
- Plamenik s azbestnom mrežicom
- Mufolna peć KR-170, Heraeus (Hanau, Njemačka)
- Porculanske zdjelice
- Uređaj za atomsku spektrometriju uz induktivno spregnutu plazmu Prodigy High Dispersive ICP (Mason, SAD)

- Uređaj za mineralizaciju – blok za spaljivanje, Tecator Digestion System 6, 1007 Digester, Foss Tecator (Hilleroed, Danska)
- Uređaj za destilaciju, Kjeltex TM 2100, Foss Tecator (Hilleroed, Danska)
- Tecator kivete za Kjeltex sustav
- Erlenmeyerova tikvica
- Bireta za titraciju
- Povratno hladilo za kondenzaciju otapala
- Rotacijski uparivač, Heidolph (Schwabach, Njemačka)
- Celulozna čahura, vata
- Kuglice za vrenje, stakleni lijevak
- Whatman br. 4 filter papir, Kefo d.o.o. (Sisak, Hrvatska)

Priprema ekstrakata

- Električni mlin, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)
- Uređaj za obradu visokim hidrostatskim tlakom, Stansted Fluid Power (Harlow, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Uređaj za ekstrakciju subkritičnom vodom, Đuro Đaković Aparati d.o.o. (Slavonski Brod, Hrvatska)
- Uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, Micro SYNTH platforma, Milestone (Soriso, Italija)
- Termometar, štoperica
- Menzura

Spektrofotometrijske analize

- Spektrofotometar Helios γ , ThermoSpectronic (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Kiveta (10 mm) za spektrofotometrijsko mjerenje
- Automatske mikropipete (Gilson, SAD)
- Staklene epruvete
- Staklene menzure
- Staklene pipete
- Odmjerne tikvice

Inkapsulacija i karakterizacija liposoma i hidrogel čestica

- Plastične šprice
- Igle 23G (0,6x30 mm) i 20G (0,9x40mm)
- Staklene i Eppendorf epruvete
- Peristaltička pumpa, Perfusor Compact Plus, B. Braun (Hessen, Njemačka)
- Laboratorijske čaše, metalno cijedilo, magneti
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (Suzhou, Kina)
- Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Uređaj za homogenizaciju reakcijske smjese – Vortex, Dlab Scientific, (Schiltigheim, Francuska)
- Mikroskop Leica DM1000 LED (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Digitalni fotoaparati PixeLINK PL-E422CU (Ottawa, Kanada).
- Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Spektrometar Nicolet iS10 ThermoScientific (Stockholm, Švedska),
- Liofilizator, Martin Christ GmbH (Osterode am Harz, Njemačka)
- Uređaj za obradu hrane pulsirajućim UV svjetlom, Polytec (Waldbronn, Njemačka)

HPLC analiza

- Celulozno-acetatni mikrofilteri veličine pora 0,45 μm (CA-45/25), Machery-Nagel (Düren, Njemačka)
- HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC-PDA sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC kolona Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 μm , 100 Å), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje osnovnog kemijskog sastava trave ive

3.2.1.1. Određivanje udjela suhe tvari

Udjel suhe tvari određen je prema modificiranoj AOAC 930.15 (1990a) metodi.

Princip metode:

Suha tvar biljnog materijala određuje se sušenjem uzorka do konstantne mase s obzirom da na temperaturi sušenja od 105 °C dolazi do izdvajanja slobodne vode iz uzorka. Udjel suhe tvari izračunava se obzirom na početnu masu uzorka.

Postupak rada:

Odvažuje se 1 g (s točnošću ± 0,0001) dobro homogeniziranog uzorka u prethodno osušenu (do konstantne mase pri 105 °C), ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem. Nepokrivena posudica s uzorkom i poklopac suše se 2 sata u sušioniku pri 105 °C (period sušenja počinje od trenutka kad je u sušnici postignuta temperatura točno 105 °C). Nakon isteka vremena sušenja, aluminijska posudica s uzorkom pokrije se poklopcem dok je još u sušioniku, prebaci u eksikator i važe čim se ohladi na sobnu temperaturu. Postupak se ponavlja dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici (s točnošću ± 0,0003 g). Ostatak uzorka u posudici predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi, udjel vode u uzorku.

Udjel vode izračuna se prema formuli [1], dok se udjel suhe tvari računa kao razlika udjela vode od 100 % [2].

$$\text{Udjel vode (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100 \quad [1]$$

$$\text{Udjel suhe tvari (\%)} = 100 \% - \text{Udjel vode (\%)} \quad [2]$$

Gdje su:

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 2 mjerenja ($n=2$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.1.2. *Određivanje udjela prehrambenih vlakana*

Udjel prehrambenih vlakana određen je prema AOAC 2011.25 (2012) metodi.

Princip metode:

Metoda AOAC 2011.25 (2012) koristi se za određivanje netopljivih prehrambenih vlakana, topljivih prehrambenih vlakana s većom molekularnom masom i topljivih prehrambenih vlakana s nižom molekularnom masom. Udio ukupnih prehrambenih vlakana u uzorcima predstavlja zbroj topljivih i netopljivih vlakana kojima je prethodno određen i oduzet udio proteina i mineralni tvari.

Postupak rada:

Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana

U svaku od četiri laboratorijske boce (250 mL) odvaži se $1,000 \pm 0,0005$ g biljnog uzorka. Uzorci se navlaže s 1,0 mL etanola te se u svaku bocu doda 40 mL prethodno pripremljene suspenzije enzima pankreatska α -amilaza/amiloglukozidaza. Uzorci se inkubiraju 16 sati na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vodenoj kupelji uz konstantno miješanje. Tijekom inkubacije dolazi do hidrolize škroba na D- glukozu, maltozu i manju količinu maltrodekstrina. Po isteku vremena inkubacije, laboratorijske boce se izvade iz vodene kupelji te se doda 3 mL otopine Tris pufera. Poklopci boca se lagano otpuste te vrata u vodenu kupelj na $95\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz konstantno miješanje. Inkubacija traje 20 minuta, a za to vrijeme inaktiviraju se enzimi pankreatska α -amilaza i amiloglukozidaza budući da se dodatkom pufera pH uzorka povisi na 8,2. Nakon inkubacije, u ohlađene uzorke doda se 0,1 mL otopine proteaze s ciljem denaturacije proteina u uzorku. Boce se poklope s čepom i stave u vodenu kupelj na 30 minuta uz konstantno miješanje. Vrijeme se počne mjeriti kada temperatura u kupelji dosegne $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon završene treće inkubacije zaustavi se miješanje te se doda 4,0 mL 2 M octene kiseline za konačno postavljanje pH vrijednosti na 4,3. Tako pripremljeni uzorak koristi se za određivanje netopljivih vlakana. Postupak započinje vakuum filtracijom uzorka kroz prethodno izvagani sinter lončić koji sadrži oko 1 gram Celita prethodno navlaženog s 15 mL 78 % (v/v) etanola. Talog zaostao na stjenki laboratorijske boce ispiri se s minimalnim volumenom (10 mL) deionizirane vode zagrijane na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobiveni filtrat se zatim prebaci u staklenu menzuru te dopuni do oznake (70 mL) s deioniziranom vodom zagrijanom na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako pripremljeni filtrat koristi se za određivanje topljivih vlakana. Talog zaostao na sinter lončiću se ispiri s 2 x 15 mL 78 % (v/v) etanola, 95

% (v/v) etanola i acetona. Nakon ispiranja, lončić se stavi u sušionik na 105 °C te se suši preko noći. Osušeni lončić hladi se u eksikatoru, a nakon hlađenja se izvaže i zabilježi masa. Masa taloga izračuna se na način da se oduzme masa lončića i Celita od mase osušenog lončića i Celita s uzorkom. Za izračun netopljivih vlakana potrebno je odrediti količinu proteina prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.4. i količinu mineralnih tvari prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.3..

Određivanje topljivih prehrambenih vlakana

Za određivanje topljivih prehrambenih vlakana koristi se uzorak koji je skupljen prilikom određivanja netopljivih vlakana. U 70 mL uzorka zagrijanog na 60 °C doda se 280 mL 95 % (v/v) etanola temperature 60 °C. Uzorak se ostavi stajati na sobnoj temperaturi 1 sat u svrhu taloženja topljivih prehrambenih vlakana. Prije filtracije uzorka potrebno je rasporediti Celite po lončiću koristeći 15 mL 78 %-tnog (v/v) etanola koji se zatim usisa. Lončići s Celitom se prethodno izvažu te im se zabilježi masa. Uzorak se filtrira kroz lončić. Za kvantitativno prenošenje i ispiranje ostatka taloga iz boca u lončić koristi se špatula i 78 % etanol. Nakon filtracije talog se ispere sa 2 x 15 ml 78 % (v/v) etanola, 95 % (v/v) etanola i acetona („sušenje izmjenom otapala“). Isprani talog u lončiću suši se u sušioniku preko noći na 103 °C. Osušeni lončić stavi se u eksikator, a nakon hlađenja se izvaže i zabilježi masa. Masa taloga izračuna se na način da se oduzme masa lončića i Celita od mase osušenog lončića i Celita s uzorkom. Za izračun topljivih prehrambenih vlakana potrebno je izračunati količinu proteina i pepela na jednak način kao i kod netopljivih prehrambenih vlakana. Dobiveni rezultati izraženi su kao maseni udjel u suhoj tvari početnog uzorka (% s. t.)

3.2.1.3. Određivanje udjela mineralnih tvari

Određivanje udjela mineralnog ostatka provedeno je prema normi HRN EN ISO 2171 (2010).

Princip metode:

Uzorak se prvo karbonizira na plameniku, a zatim mineralizira u mufolnoj peći sve dok se ne dobije jednolični svijetlo sivi pepeo konstantne mase.

Postupak rada:

Dobro homogenizirani uzorak odvagane se ($2 \pm 0,0001$ g) u prethodno izžarenu, ohlađenu i izvaganu porculansku zdjelicu u kojoj se nalazi kvarcni pijesak. Uzorak u zdjelici se zagrijava

na plameniku dok ne pougljeni, a zatim se stavi u mufolnu peć koja je zagrijana na temperaturu od 550 °C. Zdjelica s pijeskom i uzorak se ostave u mufolnoj peći sve do pojave jednoličnog svijetlo sivog pepela konstantne mase. Nakon što je mineralizacija gotova, zdjelica s pijeskom i uzorak se hlade u eksikatoru i izvažu.

Postupak za računanje udjela pepela u uzorku prikazan je jednadžbom [3]:

$$\text{Udjel pepela (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} * 100 \quad [3]$$

gdje je:

m_1 – masa prazne porculanske zdjelice i kvarcnog pijeska (g)

m_2 – masa porculanske zdjelice, kvarcnog pijeska i uzorka prije spaljivanja (g)

m_3 – masa porculanske zdjelice, kvarcnog pijeska i pepela (g)

Određivanje udjela mineralne tvari provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari početnog uzorka (% s. t.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.1.4. Određivanje udjela proteina

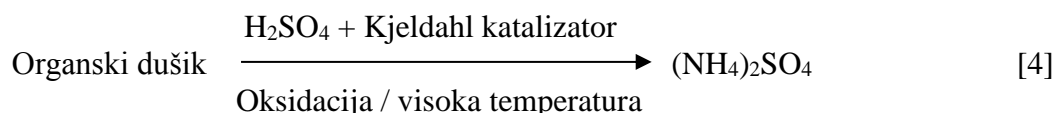
Udjel proteina određen je prema standardnoj HRN EN ISO 20483 (2014) metodi.

Princip metode:

Kjeldahlovim postupkom određuje se ukupni dušik prisutan u amino skupinama u uzorku (npr. proteinski dušik, amino dušik i amido dušik). Udjel dušika se zatim preračunava u udjel proteina množenjem postotka dušika s odgovarajućim faktorom pretvorbe $F (100/X)$ pri čemu je X postotak dušika u proteinima određene namirnice ili skupine namirnica. Određivanje udjela proteina odvija se u četiri koraka, a to su mineralizacija (spaljivanje), alkalizacija s NaOH u suvišku, destilacija i titracija.

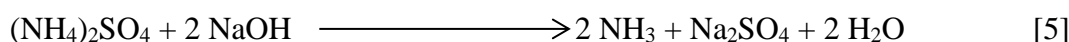
1. Mineralizacija

Prilikom zagrijavanja uzorka uz dodatak sumporne kiseline i katalizatora, koji joj povisuje vrelište i na taj način ubrzava reakciju, dolazi do razaranja organskih tvari u uzorku. Razaranje uzrokuje oslobađanje proteinskog i neproteinskog dušika (osim dušika vezanog uz nitrata i nitrite) koji zaostaje u obliku amonijevog sulfata [4].



2. Alkalizacija s NaOH u suvišku

Dodatkom natrijeva hidroksida, iz amonijeva sulfata oslobađa se amonijak [5].



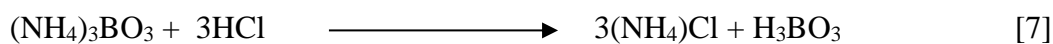
3. Destilacija u bornu kiselinu u suvišku

Oslobodeni amonijak predestilira se u bornu kiselinu pri čemu nastaje amonijev borat [6].



4. Titracija amonijevog borata klorovodičnom kiselinom

Nastali amonijev borat titrira se klorovodičnom kiselinom iz čega nastaje amonijev klorid i borna kiselina [7].



Postupak rada:

U Tecator kivete odvaži se približno 1 g s točnošću $\pm 0,0001$ g homogeniziranog uzorka. U kivetu se stavi jedna tableta Kjeldah indikatora i 12 mL 96 % sumporne kiseline te se lagano miješa dok se uzorak u potpunosti ne navlaži s kiselinom. Stalak s epruvetama stavi se u digestijsku jedinicu za spaljivanje i uključi se sistem za odvod para. Prvih 10 minuta spaljivanje se provodi uz maksimalan protok vode nakon čega se protok vode smanji za 50 %. Uzorak je u potpunosti spaljen kada zaostane samo bistra plavo-zelena tekućina bez crnih ostataka. Sadržaj u kiveti se ohladi na sobnu temperaturu te se u svaku kivetu oprezno doda 80 mL destilirane vode. Kiveta se umetne u Kjeltec uređaj u jedinicu za destilaciju, a na izlaz se postavi Erlenmeyerova tikvica s 25 mL 4 % borne kiseline. Destilacija se odvija automatski otprilike 4 minute. Dobiveni destilat je zelene boje što ukazuje na prisustvo amonijaka, a zatim se destilat titrira s kloridnom kiselinom do promjene boje iz zelene u ružičastu. Potrebno je zapisati utrošak kloridne kiseline za titraciju.

Udjel dušika u uzorku računa se pomoću sljedeće jednadžbe [8]:

$$\text{Udjel ukupnog dušika (\%)} = \frac{(a-b) * N * f * 1,4007}{m (\text{uzorka})} \quad [8]$$

a = volumen HCl utrošen za titraciju uzorka u ml

b = volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe u ml

N = molaritet kiseline

f = faktor kiseline

m = masa uzorka u g

Udjel bjelančevina u uzorku računa se pomoću sljedeće jednadžbe [9]:

$$\% \text{ bjelančevina} = \% \text{ N} \times F \quad [9]$$

Faktor (F) za preračunavanje dušika u bjelančevine:

5,7 za pšenicu i mlinske proizvode *

6,38 za kazein i kazeinate

6,25 za sve ostale proizvode.

Određivanje udjela proteina Kjeldahlovim postupkom provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari početnog uzorka (% s. t.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.1.5. Određivanje udjela masti

Udjel masti određen je prema modificiranoj AOAC 920.39 (1990b) metodi.

Princip metode:

Metoda se temelji na selektivnoj ekstrakciji lipidnih komponenata biljnog matriksa primjenom nepolarnog organskog otapala koje cirkulira principom isparavanja i kondenzacije u zatvorenoj aparaturi po Soxhlet-u. Lipidna frakcija se prilikom ekstrakcije zasebno izdvaja u tikvici.

Postupak rada:

Aparaturu po Soxhletu čini staklena tikvica od 250 mL s ravnim dnom na koju se nastavlja stakleni ekstraktor u kojem se nalazi čahura s uzorkom, te na ekstraktor vertikalno

vodeno hladilo u kojem dolazi do kondenzacije ishlapljenog otapala koje se potom skuplja u ekstraktoru te se iz istoga prelijeva u tikvicu iz koje potom ponovo isparava. Isparavanje otapala uvjetovano je toplinom koja se postiže korištenjem pješčane kupelji.

Odvaže se 5 g osušenog i usitnjenog uzorka u celulozne čahure koje se začepe na vrhu suhom vatom te se postave uspravno u Soxhlet ekstraktor. U ekstraktor se pomoću lijevka ulijeva otapalo u volumenu 2 ekstraktora (volumen ekstraktora je volumen otapala potreban da se otapalo prelije iz ekstraktora u tikvicu preko preljevnice cijevi). Tikvica s kuglicama za vrenje i ekstraktorom spoji se na hladilo i započne se sa zagrijavanjem. Ekstrakcija traje 6 sati uz brzinu ekstrakcije 10-12 sifona po satu pri čemu je jedan sifon oznaka za jednu izmjenu otapala iz ekstraktora u tikvicu preko preljevnice cijevi nakon čega se tikvica s otapalom i ekstrahiranom masti odvoji od ostatka aparature. Otapalo iz tikvice se otpari na rotacijskom vakuum uparivaču nakon čega se tikvica s ekstrahiranom masti suši do konstantne mase pri 105 °C. Uzorak se zatim hladi u eksikatoru i važe.

Masa ekstrahirane masti izračuna se iz razlike konstantnih masa tikvice s ekstrahiranom masti i prazne tikvice s kuglicama za vrenje, dok se udjel računa obzirom na masu početnog uzorka (ili suhe tvari) korištenog za ekstrakciju [10].

$$(\%) \text{ masti} = \frac{m_2 - m_1}{m_3} * 100 \quad [10]$$

gdje je:

m_1 - masa prazne tikvice s kuglicama za vrenje (g)

m_2 - masa tikvice s ekstrahiranom masti (g)

m_3 - početna masa uzorka u celuloznoj čahuri (g)

Određivanje udjela masti ekstrakcijom po Soxhletu provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari početnog uzorka (% s. t.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.1.6. Određivanje udjela makro- i mikroelemenata

Atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) određeni su makroelementi i mikroelementi u uzorku trave ive. U uzorcima su određeni udjeli sljedećih elemenata: As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Sn, Tl, V i Zn.

Uzorak trave ive (0,250 g) mikrovalno je razoren uz dodatak 5 mL HNO₃ (50 %, v/v) (tablice 3 i 4). Uzorak je ostavljen u teflonskoj posudi da se ohladi, a zatim razrijeđen s ultračistom vodom na konačni volumen od 25 mL. Razaranje i mjerenja ponovljeni su tri puta. Prije mjerenja uzorci su profiltrirani (crna vrpca).

Tablica 3. Uvjeti mikrovalnog razaranja

	1	2	3
T (°C)	150	160	190
P (W)	80	80	80
T (min)	10	10	20

Tablica 4. Uvjeti mjerenja na ICP-AES instrumentu

INSTRUMENT	Prodigy High Dispersive ICP
SPEKTROMETAR	Ešelatnog tipa
RF-GENERATOR	„free running“ 40 MHz
PROTOK PLINA (ARGON)	Vanjski: 18 L min ⁻¹ ; Pomoćni: 0,8 L min ⁻¹ ; Za raspršivanje: 36 psi
PLAMENIK	Fasselov tip , DUAL-VIEW
RASPRŠIVAČ	Pneumatski
KOMORA ZA RASPRŠIVANJE	Ciklonska

3.2.2. Određivanje udjela pojedinih pigmenata trave ive

3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnog klorofila

Princip metode:

Metoda (Huang i sur., 2007) se temelji na ekstrakciji klorofilnih pigmenata iz biljnog uzorka primjenom 80 % acetona. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama 663 i 645 nm, a kvantifikacija pojedinog pigmenta provodi se prema poznatim jednadžbama.

Postupak rada:

0,15 g uzorka ekstrahira se s 50 mL 80 % (v/v) acetona uz snažno miješanje 2 minute, a zatim se profiltrira kroz filter papir. Falcon-ica se do oznake od 50 mL nadopuni 80% (v/v) acetonom. Izmjeri se apsorbancija filtrata na valnim duljinama od $\lambda=663$ nm za klorofil *a* i na $\lambda=645$ nm za klorofil *b*.

Udjeli klorofila *a* i *b* izračunavaju se prema jednadžbama [11] i [12], a ukupni klorofil (mg L^{-1}) prema jednadžbi [13]:

$$\text{Klorofil } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 12,7 \times A_{663} - 2,95 \times A_{663} \quad [11]$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 22,95 \times A_{645} - 4,67 \times A_{645} \quad [12]$$

$$\text{Ukupni klorofil} = \text{klorofil } a + \text{klorofil } b \quad [13]$$

Rezultati se izražavaju kao [14]:

$$\text{Ukupni klorofil (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{ukupni klorofil (mg L}^{-1}\text{)} * 50 \text{ mL}}{\text{masa uzorka} * 1000} \quad [14]$$

Određivanje udjela klorofila u uzorcima provodi se u duplikatu, a rezultati su izražavaju kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama, u μg klorofila g^{-1} suhe tvari uzorka.

3.2.2.2. *Određivanje udjela ukupnih karotenoida*

Princip metode:

Metoda Barros i suradnika (2008) temelji se na ekstrakcija likopena i β -karotena iz biljnog materijala primjenom acetona i heksana pomiješanih u omjeru 4:6. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama $\lambda=453$, 505 i 663 nm. Udjeli β -karotena i likopena izračunaju se prema zadanim jednadžbama.

Postupak rada:

100 mg usitnjenog biljnog materijala snažno se miješa sa mješavinom acetona i heksana (4:6, 10 mL) 1 minutu i zatim profiltrira kroz filter papir Whatman br. 4. Izmjeri se apsorbancija filtrata na $\lambda=453$, 505 i 663 nm.

Udjeli likopena i β -karotena izračunavaju se prema jednadžbama [15] i [16]:

$$\text{Likopen (mg (100 mL)}^{-1}) = -0.0458 \cdot A_{663} + 0.372 \cdot A_{505} - 0.0806 \cdot A_{453} \quad [15]$$

$$\beta\text{-karoten (mg (100 mL)}^{-1}) = 0.216 \cdot A_{663} - 0.304 \cdot A_{505} + 0.452 \cdot A_{453} \quad [16]$$

Određivanje udjela karotenoida u uzorcima provodi se u duplikatu, a rezultati se izražavaju kao μg karotenoida g^{-1} suhe tvari uzorka.

3.2.2.3. *Određivanje udjela ukupnih antocijana*

Princip metode:

Metoda se bazira na činjenici da se ion HSO_3^- veže na antocijane na položaju 2' te tako prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Istovremeno se paralelni uzorak tretira destiliranom vodom. Razlika apsorbancije oba uzorka proporcionalna je udjelu antocijana (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada:

Odvaži se 0,2 g usitnjenog biljnog materijala, doda 2 mL 96% zakiseljenog EtOH i 40 mL 2% HCl. Smjesa se dobro promiješa i centrifugira 10 minuta pri 4500 o/min, nakon čega se 10 mL supernatanta otpipetira u dvije epruvete. U prvu se dodaje 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15% natrij hidrogensulfita. Epruvete stoje 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija na 520 nm (slijepa proba: 2% HCl).

Udjel antocijana (A_c) u ispitivanom uzorku računa se prema jednadžbi [17]:

$$A_c (\text{mg L}^{-1}) = 615 \cdot (A_1 - A_2) \quad [17]$$

gdje je:

615 - faktor preračunavanja

A_1 - apsorbancija uzorka tretiranog vodom

A_2 - apsorbancija uzorka tretiranog natrijevim hidrogensulfitom

Određivanje udjela antocijana u uzorcima provodi se u duplikatu, a rezultati se izražavaju kao μg antocijana g^{-1} suhe tvari uzorka.

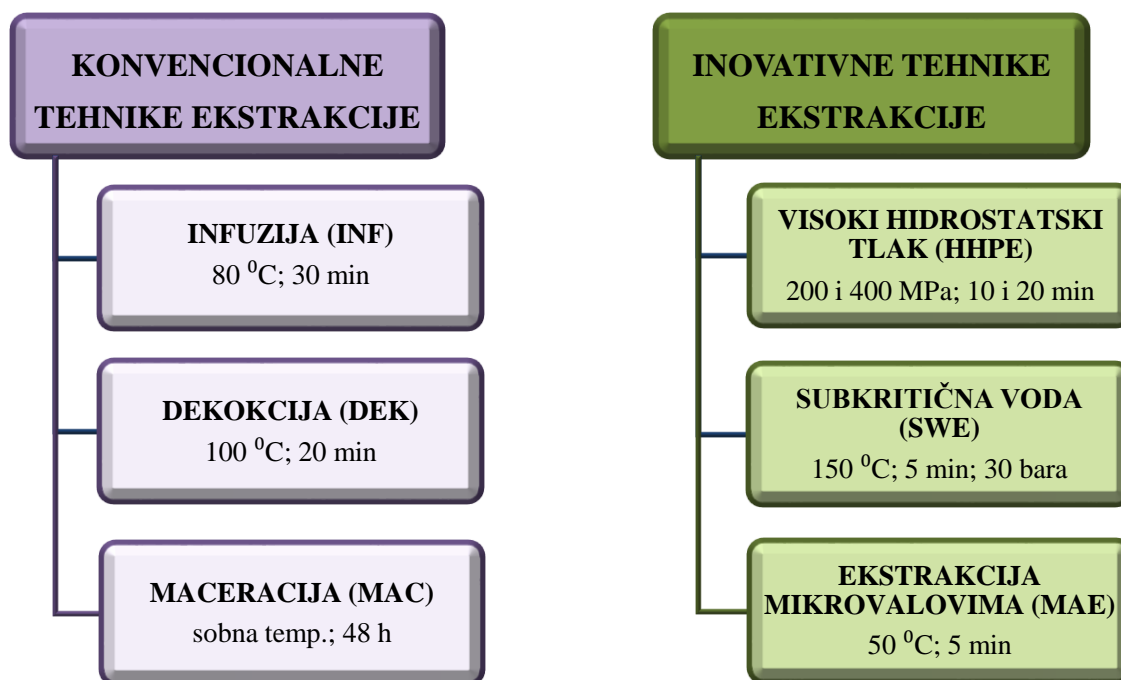
3.2.3. Priprema polifenolnog ekstrakta trave ive

3.2.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

Polifenolni ekstrakt trave ive pripremljen je infuzijom (INF), dekokcijom (DEK) i maceracijom (MAC) (slika 6). Kao otapalo korištena je destilirana voda, a omjer uzorak/otapalo (1:25, w/v) je bio isti za sve tri tehnike ekstrakcije. Ekstrakcija infuzijom provedena je tijekom 30 minuta na temperaturi od 80 °C uz konstantno miješanje. Ekstrakcija polifenola dekokcijom provedena je pri temperaturi od 100 °C tijekom 20 minuta, dok je macerat sakupljen nakon 48 satne ekstrakcije polifenolnih spojeva na sobnoj temperaturi. Dobiveni uzorci su centrifugirani (9500 RPM, 20 minuta) i filtrirani preko Whatman br. 4 filter papira. Ekstrakti su pohranjeni na + 4 °C do daljnjih analiza.

3.2.3.2. Inovativne tehnike ekstrakcije

Polifenolni ekstrakti trave ive pripremljeni su ekstrakcijom visokim hidrostatskim tlakom (HHPE), ekstrakcijom subkritičnom vodom (SWE) i ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE) (slika 6). Sve tehnike ekstrakcije provedene su korištenjem destilirane vode kao otapala, s istim omjerom uzorak/otapalo (1:25, w/v). Kod ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom uzorak se izvaže u plastičnu bocu te se doda voda. Zatvorena boca stavi se u plastičnu vrećicu i vakumira. Vakumirani uzorci potom se stavljaju u uređaj za visoki hidrostatski tlak (Stansted Fluid Power), a ekstrakcija se provodi pri različitim parametrima tlaka (200 i 400 MPa) i vremena (10 i 20 minuta). Ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE) provedena je u odgovarajućem sustavu, koji su prethodno opisali Jokić i suradnici (2018). Ekstrakcija je izvedena tijekom 5 minuta na temperaturi od 150 °C uz tlak od 30 bara. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) provedena je u Micro SYNTH platformi na temperaturi od 50 °C tijekom 5 minuta. Dobiveni ekstrakti su centrifugirani (9500 RPM, 20 minuta), a potom filtrirani preko filter papira (Whatman filter papir br. 4) i pohranjeni na +4 °C do daljnjih analiza.



Slika 6. Shematski prikaz parametara konvencionalnih i inovativnih tehnika ekstrakcije

3.2.4. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta trave ive

3.2.4.1. Određivanje prinosa ekstrakcije

Princip metode:

Prinos ekstrakcije određen je kao udjel suhe tvari ekstrakta primjenom standardne metode sušenja na 105 °C prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.1.

3.2.4.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet

obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μ L uzorka, 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne (w/v) otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 μ L uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbanacije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje [18]:

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad [18]$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u dvije paralelene probe ($n=2$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (EGK) g^{-1} suhe tvari uzorka.

3.2.4.3. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom*

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbanacije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem

smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS⁺ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 µL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 sati) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije ABTS⁺ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$.

Volumen od 40 µL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS⁺ radikala u tamnoj epruveti te se nakon točno 6 minuta izmjeri apsorbancija na 734 nm. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 µL vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje glasi [19]:

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [19]$$

gdje su:

x –koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u dvije paralelene probe ($n=2$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\text{mmol Trolox-a g}^{-1}$ suhe tvari uzorka.

3.2.4.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom [20] i [21]. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorpcije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U tamnu epruvetu se otpipetira 100 μL uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 minuta po dodatku otopine DPPH mjeri apsorpcija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μL metanola.

Oduzimanjem izmjerene apsorpcije uzorka od apsorpcije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje glasi [22]:

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [22]$$

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorpcije pri 515 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorpcije o koncentraciji standarda, određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u dvije paralelene probe ($n=2$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\text{mmol Trolox-a g}^{-1}$ suhe tvari uzorka.

3.2.5. Priprema i karakterizacija liposoma s inkapsuliranim polifenolnim ekstraktom trave ive

3.2.5.1. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta trave ive liposomima

Polifenolni ekstrakt trave ive s najvišim udjelom polifenolnih spojeva inkapsulira se liposomima. Da bi se formirali liposomi s visokim stupnjem inkapsulacijske učinkovitosti, ekstrakt trave ive se neposredno prije inkapsulacije liofilizira te usitni u tarioniku. Kao materijal za formiranje liposoma koristi se fosfolipid, a liposomi se pripreme u tri različita omjera liofiliziranog ekstrakta trave ive i fosfolipida, 1:5, 1:10 i 1:20.

U Erlenmayerovoj tikvici otopi se jednaka masa Phospholipona 90G i etanola uz miješanje na magnetskoj miješalici na brzini od 140 RPM. Važno je zatvoriti vrh tikvice aluminijskom folijom kako bi se spriječila evaporacija etanola. Da bi se pospješilo otapanje fosfolipida u etanolu, tikvica se stavi u vodenu kupelj (60 °C) na 1 minutu. Nakon što se fosfolipidi otope, u smjesu se direktno doda prethodno pripremljena otopina liofiliziranog ekstrakta trave ive. Smjesa se potom zagrijava u vodenoj kupelji (60 °C) 2 minute, a zatim ohladi na sobnoj temperaturi u mraku. Pomoću peristaltičke pumpe u Erlenmayerovu tikvicu s fosfolipidima, etanolom i ekstraktom doda se destilirana voda. Protok vode podesi se na 15 mL h⁻¹ a brzina miješanja poveća na 650-700 RPM. Tijekom miješanja važno je tikvicu obložiti aluminijskom folijom kako bi se spriječio negativan utjecaj svjetla na fosfolipide i degradacija bioaktivnih spojeva. Dobivena suspenzija liposoma čuva se na +4 °C do daljnjih analiza.

3.2.5.2. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika liposoma

Određivanje veličine i zeta potencijala liposoma

Veličina i zeta potencijal liposoma određuje se na uređaju Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo). Uzorci se za potrebe analize prethodno razrijede destiliranom vodom 200 x.

Određivanje FTIR spektra liposoma

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) primijeni se na prazne liposome i liposome s inkapsuliranim ekstraktom trave ive s omjerom ekstrakta i fosfolipida 1:20. Infracrveni spektri uzoraka (~2 mg) snime su tehnikom atenuirane totalne refleksije (ATR) na spektrometru Nicolet iS10 (ThermoScientific, Švedska) u rasponu valnih

brojeva od 4000 – 400 cm^{-1} . Uzorci se za potrebe analize prethodno razrijede destiliranom vodom 200 x.

3.2.5.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenolnih spojeva liposomima

Udjel polifenola imobiliziranih u liposomima odredi se tako da se u staklenoj epruveti najprije pripremi suspenzija koja se sastoji od 1 mL prethodno pripremljenih liposoma (opisano u poglavlju 3.2.5.1.) i 9 mL destilirane vode. 1 mL pripremljene suspenzije prebaci se u Eppendorf epruvetu te centrifugira na 9500 RPM, 45 minuta. Dobiveni supernatant odvoji se od taloga te čuva u zamrzivaču na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnjih analiza. U čiste staklene epruvete doda se 1 mL metanola, 1 mL kloroforma te talog liposoma koji je prethodno resuspendiran u 1 mL destilirane vode. Nakon snažnog vorteksiranja i odvajanja faza metanol-kloroform, gornja vodeno-metanolna faza koja sadrži inkapsulirane polifenole prebaci se u čistu Eppendorf epruvetu te skladišti na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnjih analiza na HPLC uređaju. Na temelju HPLC analize izračuna se postotak inkapsulacije polifenola koji se definira kao postotak bioaktivnih spojeva inkapsuliranih u liposome u odnosu na ukupnu količinu bioaktivnih spojeva.

3.2.5.4. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti inkapsuliranog ekstrakta trave ive tiobarbiturnom kiselinom (TBARS test)

Peroksidacija liposoma s i bez inkapsuliranih bioaktivnih spojeva trave ive odredi se testom s tiobarbiturnom kiselinom. Liposomi bez inkapsuliranog ekstrakta (kontrola) i s inkapsuliranim ekstraktom izlože se djelovanju pulsirajućeg UV zračenja. Za vrijeme tretmana iz suspenzije liposoma izuzima se alikvot od 250 μL nakon 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110 i 130 pulseva UV zračenja i prenese u Eppendorf epruvetu. Za to vrijeme, u staklene epruvete doda se 3 mL 20 %-tne otopine trikloroetene kiseline i 1 mL stock otopine koja se sastoji od 2 %-tne tiobarbiturne kiseline i 20 %-tne perklorne kiseline. Test s tiobarbiturnom kiselinom započinje dodatkom 0,2 mL uzorka liposoma u staklene epruvete. Sadržaj epruveta se dobro promiješa, a zatim zagrijava u vodenoj kupelji na $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 25 minuta. Po isteku vremena, reakcija se zaustavlja stavljanjem epruveta u hladnu vodu 5 minuta. Radi uklanjanja nastalog taloga, uzorci se centrifugiraju na 5000 RPM, 10 minuta. Apsorbancija supernatanta mjeri se na UV-VIS spektrofotometru na 532 nm. Ružičasta boja supernatanta rezultat je reakcije tiobarbiturne kiseline s lipidnim hidroperoksidima.

3.2.6. Inkapsulacija liposoma ionskim geliranjem

Nakon što se pripremljenim sustavima liposoma (1:5, 1:10 i 1:20) odrede udjeli ukupnih polifenolnih spojeva prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.4.2. te antioksidacijski kapacitet (opisano u poglavljima 3.2.4.3. i 3.2.4.4.), suspenzija liposoma s najvišim udjelom bioaktivnih spojeva se dodatno obloži alginatom i pektinom tehnikom ionskog geliranja. Zbog razlike u viskoznosti alginatnih i pektinskih otopina te u svrhu formiranja sferičnih čestica, pripreme se 3 %-tna (w/v) otopina alginata i 10 %-tna (w/v) otopina pektina. Obje otopine se pripreme u vodenom ekstraktu trave ive dobivenom tehnikom infuzije. Postupak inkapsulacije provodi se ukapavanjem otopine nosača u 3 %-tnu (w/v), odnosno 10 %-tnu (w/v) otopinu kalcijevog klorida koje su također prethodno pripremljene u ekstraktu trave ive. Otopina nosača prenese se u plastičnu špricu te istiskuje kroz iglu od 23 G (0,6x30mm) u slučaju alginata te kroz iglu od 20 G (0,9x40 mm) u slučaju pektina u otopinu gelirajućeg medija koja se konstantno miješa, pri čemu dolazi do interakcije guluronskih jedinica alginata, odnosno galakturonskih jedinica pektina s ionima kalcija što rezultira formiranjem sferičnih čestica. Nakon formiranja svih čestica, iste se u svrhu očvršćivanja miješaju na magnetskoj miješalici dodatnih 30 minuta te potom izdvoje iz otopine gelirajućeg medija, isperu ekstraktom trave ive i spreme u ekstrakt na + 4 °C na tamnom mjestu do daljnjih analiza.

3.2.6.1. Određivanje morfoloških karakteristika liposoma obloženih alginatom i pektinom

Morfološke karakteristike liposoma obloženih alginatom i pektinom ispituju se pomoću svjetlosnog mikroskopa Leica DM1000 LED (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) uz odgovarajuće povećanje. Fotografije mikročestica snimaju se digitalnim fotoaparatom PixeLINK PL-E422CU (Ottawa, Kanada).

3.2.6.2. Određivanje učinkovitosti zadržavanja polifenolnih spojeva u liposomima te u liposomima obloženim alginatom i pektinom

Učinkovitost zadržavanja polifenolnih spojeva u liposomima obloženima alginatom i pektinom ispituje se dodatkom hidrogel čestica, pripremljenih prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.6., u prethodno pripremljene uzorke kave. Liposomi obloženi 3 % alginatom i 10 % pektinom se neposredno prije analize liofiliziraju. Uzorci kave pripremaju se prelijevanjem 7 g kave s 50 mL ključale destilirane vode. Ekstrakcija traje 5 minuta nakon čega se dobiveni

uzorci filtriraju preko Whatman br. 4 filter papira. Potom se u 7 g ohlađene kave doda 0,5 g suspenzije liposoma ili liofiliziranih čestica liposoma obloženih 3 % alginatom ili liofiliziranih čestica liposoma obloženih 10 % pektinom. Uzorci se pripremaju u duplikatu. U periodu od mjesec dana, svakih tjedan dana uzima se alikvot od 250 μL koji se pohrani na + 4 °C do daljnjih analiza na HPLC uređaju.

3.2.7. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Pojedinačni polifenolni spojevi odrede se primjenom HPLC metode u ekstraktima trave ive dobivenim inovativnim i konvencionalnim tehnikama ekstrakcije kao i u otopini razbijenih čestica liposoma (1:5, 1:10, 1:20) u svrhu određivanja inkapsulacijske učinkovitosti. Također, prisutnost pojedinih polifenolnih spojeva ispita se i u uzorcima kave s dodatkom suspenzije liposoma, s ciljem određivanja učinkovitosti zadržavanja polifenolnih spojeva u polimerom obloženim liposomima u vremenskom periodu od četiri tjedna.

Uzorci se prije injektiranja u kromatografski sustav razrijede u odgovarajućem omjeru te zatim profiltriraju kroz celulozno-acetatne mikrofiltere veličine pora 0,45 μm . U kromatografski sustav injektira se 10 μL profiltriranog uzorka.

HPLC analiza provodi se na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 na Zorbax C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 μm , 100 Å) kromatografskoj koloni (nepolarna stacionarna faza) na temelju različitosti u polarnosti pojedinih komponenata. Elucija se provodi gradijentno (tablica 5).

Mobilna faza: otapalo A - 1 % otopina mravlje kiseline u vodi (v/v)

otapalo B - 1 % otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (v/v)

Temperatura kolone: 25 °C

Protok: 1 mL min⁻¹

Detekcija: UV/VIS Photo Diode Array ($\lambda = 320 \text{ nm}$)

Vrijeme trajanje analize: 52 minute

Tablica 5. Gradijent otapala za HPLC analizu polifenolnih spojeva

VRIJEME (min)	VOLUMNI UDIO OTAPALA A (%)	VOLUMNI UDIO OTAPALA B (%)	PROTOK (mL min⁻¹)
0	93	7	1
5	93	7	1
45	60	40	1
47	30	70	1
52	30	70	1

Detekcija specifičnih polifenolnih spojeva obavlja se snimanjem eluata pomoću Photo Diode Array (PDA) detektora na valnoj duljini 320 nm što rezultira specifičnim kromatogramima uzoraka. Identifikacija polifenolnih spojeva provodi se uspoređivanjem dobivenih retencijskih vremena s retencijskim vremenima komercijalno dostupnih HPLC standarada, dok se kvantifikacija vrši pomoću jednadžbi baždarnih krivulja (20 – 100 µg mL⁻¹) za ehinakozid i verbaskozid (tablica 6).

Tablica 6. Baždarni pravci identificiranih polifenolnih spojeva u ispitanim uzorcima

NAZIV SPOJA	JEDNADŽBA BAŽDARNOG PRAVCA
Ehinakozid	$y = 6,0269x + 3,002$
Verbaskozid	$y = 0,7435x - 0,1647$

HPLC analize provode se u dvije paralelne probe te se prikazuju kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Dobiveni rezultati se izražavaju kao mg pojedinog spoja g⁻¹ suhe tvari uzorka za uzorke ekstrakata, kao postotak (%) u slučaju određivanja stupnja inkapsulacijske učinkovitosti ili kao mg spoja g⁻¹ liposoma prilikom određivanja učinkovitosti zadržavanja polifenolnog ekstrakta u liposomima obloženim alginatom i pektinom. Za prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom koristi se aplikacija Star Chromatography Workstation Version 5, dok se obrada rezultata provodi pomoću programa Microsoft Office Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tržište funkcionalne hrane posljednjih je desetljeća doživjelo veliki rast zbog povećane svijesti potrošača o zdravom načinu života, stoga je ovo istraživanje provedeno s ciljem usporedbe utjecaja različitih parametara konvencionalnih i inovativnih tehnika ekstrakcije na prinos bioaktivnih spojeva trave ive (*Teucrium montanum* L.) koji su potom inkapsulirani liposomima u svrhu povećanja njihove stabilnosti i bioraspoloživosti. Također, ispitan je potencijal primjene liposoma s inkapsuliranim ekstraktom trave ive u razvoju funkcionalnog napitka kave.

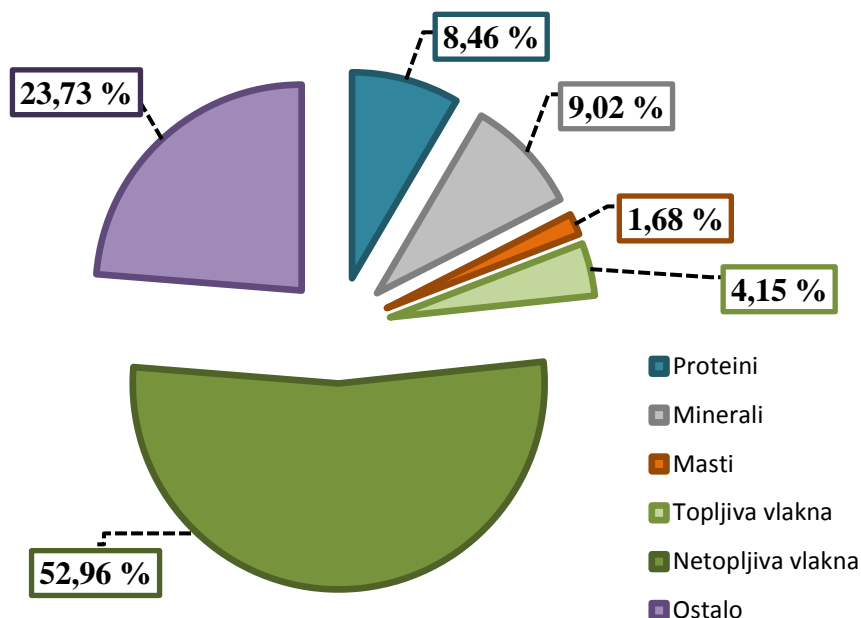
Osušenom i usitnjenom biljnom materijalu trave ive određen je osnovni kemijski sastav pri čemu su udjeli pojedinih sastojaka izraženi na suhu tvar uzorka (slika 7). Mineralni sastav trave ive prikazan je u tablici 7, a udjeli pojedinih pigmenata na slici 8.

U svrhu daljnjeg provođenja istraživanja pripremljeni su polifenolni ekstrakti trave ive konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, uključujući infuziju, dekokciju i maceraciju, kao i inovativnim tehnikama primjenom visokog hidrostatskog tlaka, subkritične vode te mikrovalova. Ekstrakcijski prinosi provedenih tehnika prikazani su na slici 9. Također, dobivenim ekstraktima određen je udjel ukupnih polifenolnih spojeva (slika 10), kao i antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodama (slika 11). Pojedinačni polifenolni spojevi određeni su u svim ekstraktima primjenom HPLC metode, a rezultati su prikazani na slici 12. Ekstrakt s najvišim udjelom polifenolnih spojeva je liofiliziran, usitnjen i inkapsuliran liposomima.

Nadalje, inkapsulacija liposomima provedena je pripremom četiri sustava; jedan s praznim liposomima (bez inkapsuliranog ekstrakta) i tri s različitim omjerom ekstrakta i fosfolipida (1:5, 1:10 i 1:20). Svim sustavima određeni su veličina, zeta potencijal i indeks polidisperzije (tablica 8), a praznim liposomima i liposomima 1:20 snimljeni su i FTIR spektri (slike 14 i 15). Učinkovitost inkapsulacije polifenolnih spojeva liposomima određena je primjenom HPLC-a i prikazana je na slici 16. Sustav liposoma s najvišim stupnjem inkapsulacijske učinkovitosti je dodatno obložen alginatom i pektinom s ciljem određivanja učinkovitosti zadržavanja polifenolnih spojeva u liposomima dodanima u kavu, u vremenskom periodu od četiri tjedna (slika 19). Obloženim liposomima su prethodno određene i morfološke karakteristike (slika 18). Osim toga, TBARS testom ispitan je antioksidacijska učinkovitost ekstrakta trave ive inkapsuliranog liposomima za sva tri sustava (slika 17).

4.1. ODREĐIVANJE OSNOVNOG KEMIJSKOG SASTAVA TE MIKRO- I MAKROELEMENTATA TRAVE IVE

4.1.1. Određivanje osnovnog kemijskog sastava



Slika 7. Osnovni kemijski sastav trave ive (*Teucrium montanum* L.)

Za potrebe ovog rada određen je osnovni kemijski sastav prethodno osušenog, usitnjenog i prosijanog biljnog materijala trave ive (*Teucrium montanum* L.), a udjeli pojedinih sastojaka izraženi su na suhu tvar uzorka i prikazani na slici 7.

Udio suhe tvari u uzorku trave ive određen je prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.1. te iznosi 89,34 %, dok ostalih 10,66 % čini voda. Svi sastojci suhe tvari izraženi su na suhu tvar uzorka. Na temelju rezultata prikazanih na slici 7 vidljivo je da trava iva obiluje prehranbenim vlaknima, koja čine 57,11 % ukupne suhe tvari ispitanog uzorka, od čega čak 52,96 % čine netopljiva vlakna. Dobivene vrijednosti su znatno više u odnosu na one drugih biljnih vrsta roda *Teucrium*, što potvrđuju i rad Rehman i suradnika (2016) u kojem je kod *T. mascatense* utvrđeno 17,0 % ukupnih prehranbenih vlakana, kao i rad Tunçtürk i suradnika (2019) u kojem je utvrđeno 36,83 % ukupnih vlakana kod *T. polium* i 37,15 % kod *T. chamaedrys*. Nutritivno gledano, trava iva predstavlja izuzetno dobar izvor prehranbenih vlakana koja prema Rehman i suradnicima (2016) pomažu u apsorpciji elemenata u tragovima i snižavaju koncentraciju lipida u plazmi. Također, u *T. montanum* utvrđeno je 9,02 % mineralnih tvari koje predstavljaju udio pepela, odnosno ukupni mineralni ostatak koji preostaje nakon spaljivanja organske tvari pri povišenoj temperaturi. Udio proteina izračunat je na osnovi raspoloživog dušika primjenom

Kjeldahlove metode, kojom je kod *T. montanum* utvrđeno 8,46 % proteina. Prema radu Juan i suradnika (2004), udio proteina kod biljaka roda *Teucrium* je vrlo varijabilan te se kreće od 6,4 % kod *T. dunense* do čak 43,8 % proteina kod *T. algarbiense*, što upućuje na to da jednogodišnje i višegodišnje biljke roda *Teucrium* sadrže više proteina nego grmoliko bilje istog roda. U *T. montanum* određen je udio masti od 1,68 % što je malo više u odnosu na 1,10 % koliko je utvrđeno i u uzorku *T. sandrasicum* u radu Kaska i Mammadov (2019). S obzirom da biljke roda *Teucrium* sadrže otprilike 20 % ugljikohidrata, pretpostavlja se da preostalih 23,73 % ukupne suhe tvari čine ugljikohidrati te druge komponente prisutne u tragovima koje u sklopu ovog rada nisu dodatno analizirane.

4.1.2. Određivanje udjela makro- i mikroelemenata

Tablica 7. Zastupljenost pojedinih mineralnih tvari ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$) u travi ivi

ELEMENT	Ca	K	Fe	Mg	S	P
$\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$	14959 \pm 315	11489 \pm 895	3014 \pm 367	1770 \pm 151	1937 \pm 47,5	1000 \pm 14,1
ELEMENT	Mn	Na	Zn	V	Cu	Cr
$\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$	97,60 \pm 9,90	54,3 \pm 8,70	43,40 \pm 2,11	9,14 \pm 1,60	7,95 \pm 0,16	6,03 \pm 0,77
ELEMENT	I	Pb	Ni	As	Co	Mo
$\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$	4,69 \pm 0,40	4,76 \pm 0,51	4,13 \pm 0,46	2,30 \pm 0,19	1,22 \pm 0,12	0,56 \pm 0,06
ELEMENT	Sn	Cd	Se	Tl	Sb	Hg
$\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$	0,14 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00

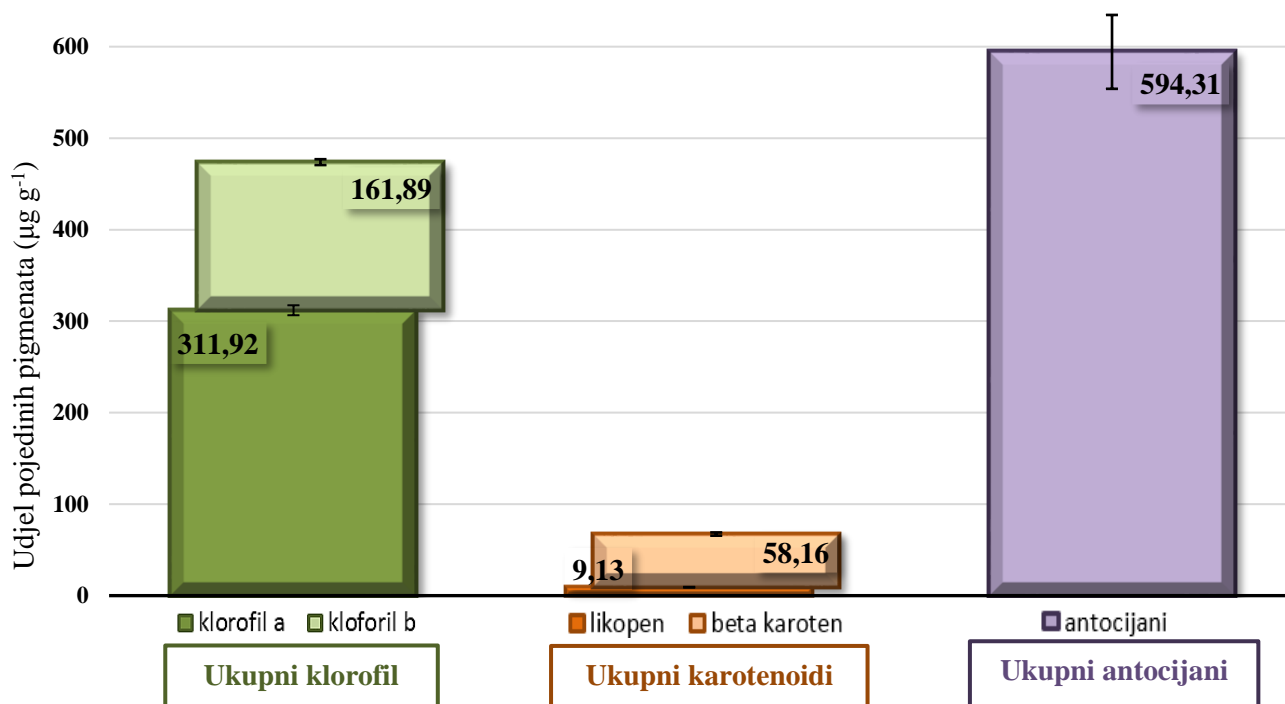
Mineralne tvari su biljkama potrebne za održavanje osmotske ravnoteže, ključne su za odvijanje normalnog metabolizma te sudjeluju kao strukturne komponente u proteinima i ugljikohidratima (Zeiner i sur., 2015). Mineralni sastav trave ive određen je atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES), a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 7.

Prema rezultatima prikazanim u tablici 7, najzastupljeniji elementi u travi ivi su kalcij (14 959 $\mu\text{g g}^{-1}$) i kalij (11 489 $\mu\text{g g}^{-1}$), a zatim slijede željezo (3 014 $\mu\text{g g}^{-1}$), magnezij (1 770 $\mu\text{g g}^{-1}$), sumpor (1 937 $\mu\text{g g}^{-1}$) i fosfor (1 000 $\mu\text{g g}^{-1}$). Dobivene vrijednosti značajno odstupaju od onih objavljenih u radu Zeiner i suradnika (2015) u kojem se na vrhu poretka nalazi kalij s 6 470 $\mu\text{g g}^{-1}$, a zatim slijede magnezij (1 430 $\mu\text{g g}^{-1}$) > željezo (107 $\mu\text{g g}^{-1}$) > kalcij (58 $\mu\text{g g}^{-1}$). Na temelju rezultata prikazanih u tablici 7 može se primijetiti da su elementi kao što su Na, Zn

i Cu, koji imaju esencijalnu funkciju u metabolizmu biljke, manje zastupljeni. Također, *T. montanum* se ne može klasificirati kao hiperakumulator teških metala kao što su olovo i živa s obzirom da prema dobivenim vrijednostima ($4,76 \mu\text{g g}^{-1}$ za Pb i $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ za Hg) nema mogućnost njihove akumulacije u visokim koncentracijama. U radu Zlatić i Stanković (2019) prezentirani su rezultati detaljnih analiza u kojim se ispitivao utjecaj dvaju različitih geoloških supstrata na mineralne karakteristike *T. montanum*. Istraživanje je obuhvaćalo komparativnu analizu koncentracije 20 elemenata (Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Se, i Zn) u uzorcima tla i nadzemnim dijelovima biljke trave ive iz različitih staništa s vapnenačkim i serpentinitnim supstratom. Određeno je da su u travi ivi elementi zastupljeni prema sljedećem redoslijedu: Ca > K > S > Mg > P > Al > Fe > Zn > Mn > B > Na > Cu > Ni > Cr > Se > Pb > Li > Co > Cd > As koji djelomično prati poredak elemenata prikazanih u tablici 7. Također, u spomenutom radu utvrđena je visoka korelacija između zastupljenosti mineralnih tvari u ispitanim staništima *T. montanum* i mineralnim tvarima prisutnima u samoj biljci, što ukazuje na značajnu fenotipsku plastičnost trave ive.

4.2. ODREĐIVANJE UDJELA POJEDINIPIH PIGMENATA TRAVE IVE

4.2.1. Određivanje udjela ukupnog klorofila, ukupnih karotenoida i antocijana



Slika 8. Udjel pojedinih pigmenata ($\mu\text{g g}^{-1}$) određenih u travi ivi

Biljni pigmenti mogu se svrstati u dvije kategorije, pigmente topive u mastima, kao što su klorofili i karotenoidi, koji se nalaze u protoplazmi biljne stanice i one topive u vodi, kao što su antocijani, koji se nalaze u staničnom soku unutar vakuola (Boo i sur., 2012). Na slici 8 nalazi se grafički prikaz udjela ($\mu\text{g g}^{-1}$) pojedinih pigmenata određenih u uzorku trave ive. Udjel klorofila izražen je kao zbroj klorofila a i klorofila b, a udjel ukupnih karotenoida kao zbroj likopena i β -karotena.

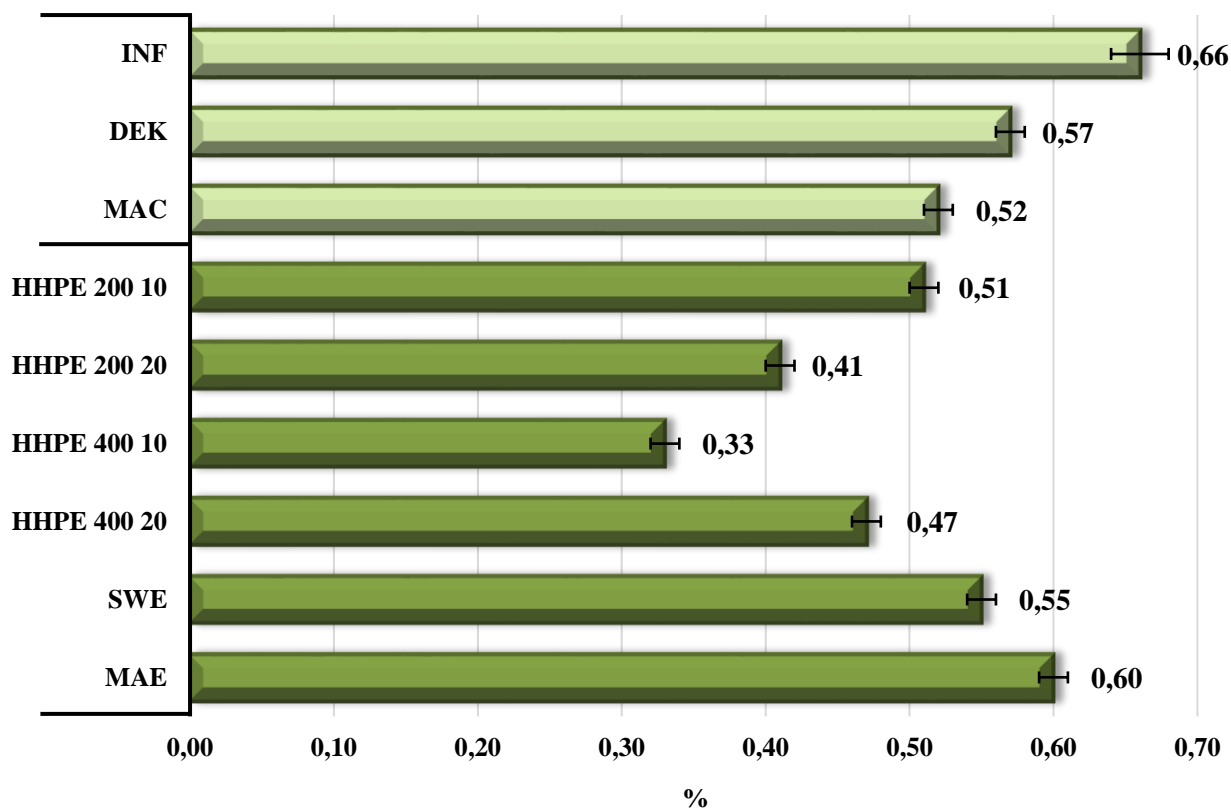
Analizirajući podatke provedenih metoda, vidljivo je kako su antocijani najzastupljeniji pigmenti ($594,31 \mu\text{g g}^{-1}$) u travi ivi. Prema radu Jordheim i suradnika (2016) uočen je tipičan uzorak antocijana koji su prisutni u svim vrsta roda *Lamiaceae* koji uključuje antocijanidin 3,5-diglukozid te aromatsku acilaciju *p*-kumarinskom i ponekad kafeinskom kiselinom. Antocijani se javljaju u svim tkivima višegodišnjih biljka, a ovisno o pH medija mogu biti od crvene do plave boje.

Klorofil apsorbira svjetlost u plavo-ljubičastom (400-500 nm) i crvenom (640-700 nm) dijelu vidljivog spektra. Zeleno svjetlo ($\sim 550 \text{ nm}$) se ne apsorbira, već se reflektira dajući klorofilu karakterističnu boju. U travi ivi kvantificirano je $473,81 \mu\text{g g}^{-1}$ ukupnih klorofila, od čega čak 66 % ($311,92 \mu\text{g g}^{-1}$) čini klorofil a, što je i očekivano s obzirom da je standardni omjer klorofila a i klorofila b u višim biljkama približno 3:1 ili blizu ovog omjera (Banik i sur., 2018). Za usporedbu, biljke roda *Urticaceae* sadrže znatno veće udjele ukupnih klorofila od roda *Lamiaceae*, čak $2091 \mu\text{g g}^{-1}$ kod odraslih biljaka *Pouzolzia zeylanica* (Tan i sur., 2018). Također, kako je već prethodno utvrđeno u travi ivi određen je visoki udio magnezija (tablica 7) koji je centralno pozicioniran u porfirinskom prstenu klorofila i time je direktno uključen u fotosintezu i rast biljke.

Nadalje, karotenoidi su tetraterpenoidi koji apsorbiraju svjetlost u plavom području vidljivog dijela spektra i imaju značajnu ulogu u organizaciji fotosintetskih membrana. Najpoznatiji karotenoidi su β -karoten (narančasti pigment), lutein (žuti pigment) i likopen (crveni pigment) (Boo i sur., 2012). Od kvantificiranih pigmenata (slika 8) u uzorku trave ive najmanje je ukupnih karotenoida, tek $67,29 \mu\text{g g}^{-1}$, pri čemu 86 % čini β -karoten, što se djelomično može pripisati vremenu berbe trave ive, s obzirom da udio pigmenata, a posebice karotenoida značajno varira ovisno o periodu u godini (Banik i sur., 2018).

4.3. KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA TRAVE IVE

4.3.1. Određivanje ekstrakcijskog prinosa



Slika 9. Prikaz prinosa ekstrakcija (%) u vodenim ekstraktima trave ive dobivenim konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije (INF – infuzija; DEK – dekokcija, MAC – maceracija, HHPE – ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom 200 ili 400 MPa, 10 ili 20 minuta; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)

Pravilnim odabirom tehnike ekstrakcije i vrste otapala mogu se dobiti ekstrakti s visokim prinosom i minimalnom promjenom funkcionalnih svojstava (Quispe Candori i sur., 2008). Mnogi faktori kao što su izbor i koncentracija otapala za ekstrakciju, omjer otapalo/uzorak i temperatura imaju značajan utjecaj na ekstrakciju i njen prinos (Radojković i sur., 2012).

Slika 9 prikazuje ekstrakcijske prinose (%) ekstrakata trave ive dobivenih konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije pri čemu je prinos ekstrakcije korišten kao pokazatelj učinaka ekstrakcijskih uvjeta. Promatrajući srednju vrijednost, ekstrakti dobiveni konvencionalnim tehnikama ekstrakcije pokazali su veći ekstrakcijski prinos u odnosu

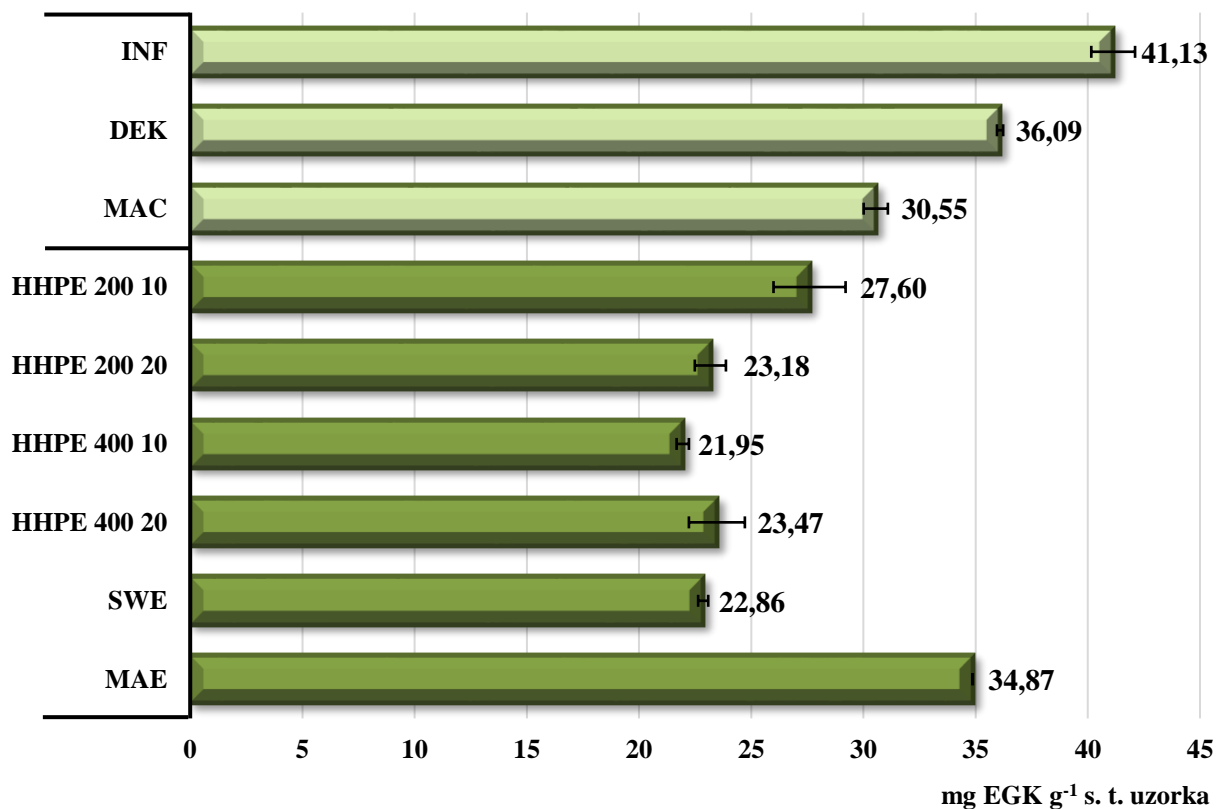
na one dobivene inovativnim tehnikama. Kod konvencionalnih tehnika ekstrakcije toplina se prenosi s površine konvekcijom i kondukcijom, zbog čega ekstrakcijski prinos uglavnom ovisi o topljivosti bioaktivnih spojeva u otapalu, o brzini prijenosa mase i jačini interakcija između otapala i matrice uzorka (Dhanani i sur., 2017). Iako konvencionalne tehnike ekstrakcije mogu rezultirati većim prinosima, inovativne tehnike su korisnije u pogledu smanjenja troškova te povećanja čistoće ekstrakata, aspekata zaštite okoliša i održivosti (Lorenzo i sur., 2018). Također, u radu je kao otapalo za ekstrakciju korištena voda, stoga je jedan od razloga relativno visokih prinosa ekstrakcije i dobra topljivosti sastojaka trave ive u vodenom mediju.

Korištenje konvencionalnih tehnika ekstrakcije poput infuzije, dekokcije i maceracije rezultiralo je određenom varijacijom prinosa što znači da temperatura i vrijeme ekstrakcije imaju značajan utjecaj na ekstrakcijski prinos. Budući da se infuzija dobila zagrijavanjem biljnog materijala toplom vodom (80 °C) određeno vrijeme (30 minuta), dekokcija se vršila kuhanjem biljnog materijala (100 °C) u vodi kratko vrijeme (20 minuta), a maceracija se provodila hladnom vodom u zatvorenoj boci duže vrijeme (48 sati), uočene razlike ne iznenađuju. Kao što se može vidjeti na slici 9 najveći ekstrakcijski prinos određen je u ekstraktu dobivenom infuzijom (INF), čak 0,66 %, a zatim slijede dekokcija (DEK) s 0,57 % te maceracija (MAC) s 0,52 %. Prema Miron i suradnicima (2011) povećanje temperature prati porast prinosa ekstrakcije zbog povećanja prijenosa mase i smanjenja viskoznosti otapala što mu pomaže da bolje proдре u matriks uzorka. Posljedično tome, maceracija (MAC) zbog ekstrakcije na sobnoj temperaturi ima najniži ekstrakcijski prinos. Ipak, prinos dekokcije (DEK) je niži od prinosa infuzije (INF) iako se dekokcija provela na višoj temperaturi, što se može objasniti degradacijom određenih sastojaka trave ive na povišenoj temperaturi što je rezultiralo nižim prinosom.

Kod inovativnih tehnika ekstrakcije, najveći prinos dobiven je ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE), 0,60 %, koji je nakon prinosa dobivenog infuzijom ujedno i najbolji rezultat. No, pri tome treba uzeti u obzir da je infuzija trajala 30 minuta da bi se dobio tek nešto viši prinos u odnosu na prinos dobiven ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima koja je trajala svega 5 minuta. MAE tehnika temelji se na principu zagrijavanja molekula vode u biljnoj stanici. Kada voda isparava, stvara se tlak na staničnu stijenkku zbog kojeg ona puca i olakšava se prijelaz sastojaka u otapalo (Aspé i Fernández, 2011). Također, drugi razlog relativno visokog prinosa MAE je lokalizirano djelovanje temperature i tlaka koji uzrokuju brzu selektivnu migraciju ciljanih spojeva iz matriksa uzorka u otapalo (Dhanani i sur., 2017). Prinos dobiven ekstrakcijom subkritičnom vodom iznosio je 0,55 %. U radu Zhang i suradnika (2018) provedena je ekstrakcija bioaktivnih spojeva ljekovite biljke ginseng (*Panax*

ginseng) konvencionalnim tehnikama ekstrakcije vodom i etanolom te ekstrakcijom subkritičnom vodom. Rezultati su pokazali da su ekstrakti dobiveni subkritičnom vodom postupno imali sve veće prinose kako je temperatura subkritične vode rasla u rasponu od 140 – 200 °C u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije. S obzirom da je za potrebe ovog rada ekstrakcija spojeva trave ive provedena subkritičnom vodom na 150 °C, a dobiveni prinos tek neznatno zaostaje za prinosom dekokcije može se pretpostaviti da bi se daljnjim povećanjem temperature, povećala brzina difuzije vode u matricu trave ive i rezultirala povećanim oslobađanjem sastojaka u otapalo, a samim time i većim prinosom. Kod ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom (HPPE) odabrani su tretmani s različitim trajanjem (10 i 20 minuta) i vrijednostima tlaka (200 i 400 MPa), kako bi se povećala propusnost stanične membrane i poboljšao prijenos mase. Najveći ekstrakcijski prinos pokazao je uzorak HPPE 200 10 koji iznosi 0,51 %, a zatim slijede HPPE 400 20 (0,47 %) > HPPE 200 20 (0,41 %) > HPPE 400 10 (0,33 %). Dobivene vrijednosti su oprečne tvrdnji Jamaludin i suradnika (2020) koji navode da je viši tlak ekstrakcije ključan za postizanje visokih prinosa, kao i za smanjenje vremena ekstrakcije. Na temelju rezultata prikazanih na slici 9 vidljivo je kako je trajanje ekstrakcije od 20 minuta rezultiralo većim ekstrakcijskim prinosom pri višem tlaku, međutim porast tlaka s 200 na 400 MPa je rezultirao manjim ekstrakcijskim prinosom kada je tretman trajao kraće, odnosno 10 minuta. Prinosi dobiveni ekstrakcijom visokim hidrostatskim tlakom su niži od prinosa dobivenih ostalim inovativnim, ali i konvencionalnim tehnikama ekstrakcije.

4.3.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola u ekstraktima



Slika 10. Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka) u ekstraktima dobivenim konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije (INF – infuzija; DEK – dekokcija, MAC – maceracija, HHPE – ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom 200 ili 400 MPa, 10 ili 20 minuta; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)

Na slici 10 prikazani su udjeli ukupnih polifenola određenih u ekstraktima trave ive dobivenim konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije. Udio ukupnih polifenola u ekstraktima izražen je kao miligram ekvivalenta galne kiseline (EGK) po gramu suhe tvari uzorka.

Uspoređujući dobivene rezultate, konvencionalne tehnike ekstrakcije rezultirale su većim udjelom ukupnih polifenola u odnosu na inovativne tehnike ekstrakcije. Udio ukupnih polifenola u uzorcima ekstrakata kretao se od 21,95 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka u ekstraktu dobivenom visokim hidrostatskim tlakom (400 MPa, 10 minuta) do 41,13 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka, koliko je određeno u infuziji. Dobiveni rezultati su znatno niži od udjela ukupnih polifenola određenih u metanolnom ekstraktu trave ive objavljenom u radu Stanković i suradnika (2011a), koji je iznosilo 169,06 mg EGK g⁻¹ uzorka. Također, utvrđeno je da se udjeli

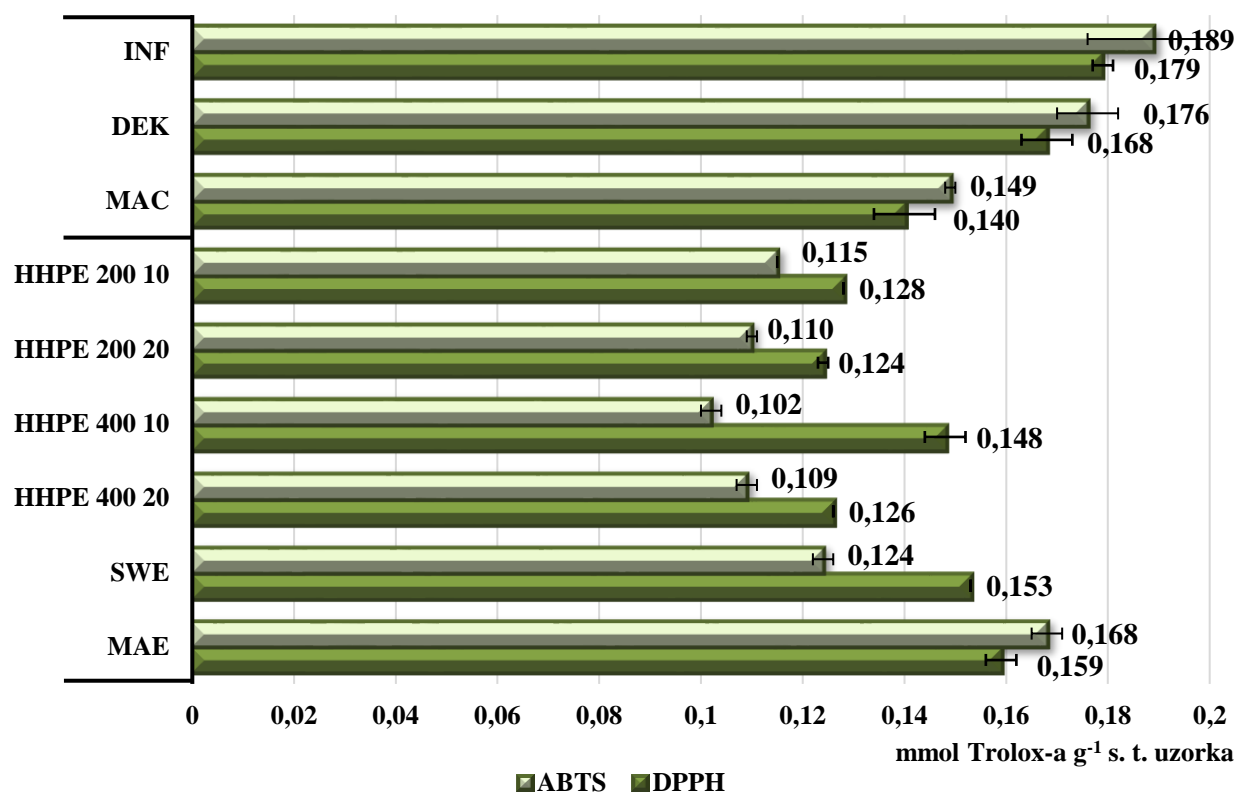
ukupnih polifenola trave ive znatno razlikuju ovisno o dijelu biljke iz kojeg su ekstrahirani, tako je najviše polifenola određeno u listu trave ive, a nešto manje u cvijetu i stabljici (Stanković i sur., 2011b).

Promatrajući rezultate samo za infuziju, dekokciju i maceraciju, primjena topline rezultirala je većim udjelom ukupnih polifenola u ekstraktima, s obzirom da je prinos ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenim na 80 °C (INF = 41,13 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka) i 100 °C (DEK = 36,09 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka) bio veći nego u ekstraktu dobivenom na sobnoj temperaturi (MAC = 30,55 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka). Također, u istraživanju Jovanović i suradnika (2017b) uočeno je kako se primjenom topline značajno skraćuje vrijeme ekstrakcije, s obzirom da je ekstrakt majčine dušice dobiven maceracijom pokazao sličan udjel polifenola (18,1 mg EGK L⁻¹) nakon 60 minuta ekstrakcije, kao i ekstrakt dobiven primjenom topline (80 °C) nakon 5 minuta ekstrakcije (18,4 mg EGK L⁻¹). Prema Mustafa i Turner (2011), uporaba toplinske energije uzrokuje povećanje učinkovitosti ekstrakcije poremećajima u staničnoj strukturi biljnog materijala. Povećanjem temperature povećava se propustljivosti stanične membrane uzrokujući smanjenje interakcija između sekundarnih metabolita i biljne matrice što rezultira poboljšanom topljivošću polifenola i ubrzanim prijenosom mase. Također, povećanje temperature otapala može smanjiti površinsku napetost i posljedično povećati vlaženje biljnog materijala što rezultira učinkovitijom ekstrakcijom (Jovanović i sur., 2017b). Ipak, visoka temperatura i dugo izlaganje mogu smanjiti prinos ukupnih polifenola zbog temperaturne osjetljivosti, enzimske razgradnje i oksidacije polifenolnih spojeva u vodenoj fazi, što je vjerojatno i razlog manjeg udjela polifenola u dekoktu u odnosu na infuziju, budući da je infuzija pripremljena na nižoj temperaturi. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2014) u kojem se pokazalo da sobna temperatura nije bila dovoljno učinkovita za ekstrakciju polifenolnih spojeva, dok je postupak dekokcije na 100 °C doveo do termičke razgradnje polifenola u nekim uzorcima.

Uspoređujući udjele polifenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim inovativnim tehnikama ekstrakcije, vidljivo je da je najveći udjel ukupnih polifenola određen u ekstraktu dobivenom primjenom mikrovalova (MAE = 34,87 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka). Ionska provodljivost i dipolna rotacija uzrokuju trenje, zagrijavanje i poremećaj staničnih struktura biljnog materijala što uzrokuje difuziju polifenola iz krute u tekuću fazu. Značajnu ulogu prilikom ekstrakcije spojeva ima izbor odgovarajućeg otapala koje treba moći apsorbirati energiju mikrovalova i pretvoriti je u toplinu (Simić i sur., 2016). U prilog tome idu rezultati istraživanja Vujanović i suradnika (2018) u kojem je ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima uz primjenu 50 % etanola kao otapala, ekstrahirano 73,60 mg EGK g⁻¹ s. t. trave

ive, što je čak 52 % više ekstrahiranih polifenolnih spojeva u odnosu na rezultat dobiven ovim istraživanjem u kojem je kao otapalo korištena isključivo voda. Autori su jasno pokazali utjecaj otapala na prinos ekstrakcije, međutim trebali bi se u obzir uzeti i drugi faktori poput snage zračenja, biljnog uzorka (sorta, zemljopisna regija, klima), prijenos mase i vrijeme ekstrakcije. Subkritičnom vodom ekstrahirano je 22,86 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka. Prema Nastić i suradnicima (2018) utjecaj tlaka na ekstrakciju polifenolnih spojeva subkritičnom vodom je zanemariv, dok je temperaturni utjecaj značajan. Povećanje udjela polifenola s temperaturom može se povezati sa smanjenjem polariteta vode pri višim temperaturama i boljom topljivošću srednje polarnih polifenola. Što se tiče ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom, uzorak HPPE 200 10 pokazao je najveći udjel ekstrahiranih polifenola (27,60 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka), dok uzorak HPPE 400 10 najniži (21,95 mg EGK g⁻¹ s. t. uzorka), što ukazuje na činjenicu da je za postizanje optimalnog udjela polifenolnih spojeva ekstrakciju potrebno provesti pri nižem tlaku (200 MPa) kraće vrijeme (10 minuta).

4.3.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ABTS i DPPH metodama



Slika 11. Antioksidacijski kapacitet ($\text{mmol Trolox-a g}^{-1}$ s. t. uzorka) ekstrakata dobivenih konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije određen ABTS i DPPH metodama (INF – infuzija; DEK – dekokcija, MAC – maceracija, HHPE – ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom 200 ili 400 MPa, 10 ili 20 minuta; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata dobivenih konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije određen je ABTS i DPPH metodama te su rezultati prikazani na slici 11.

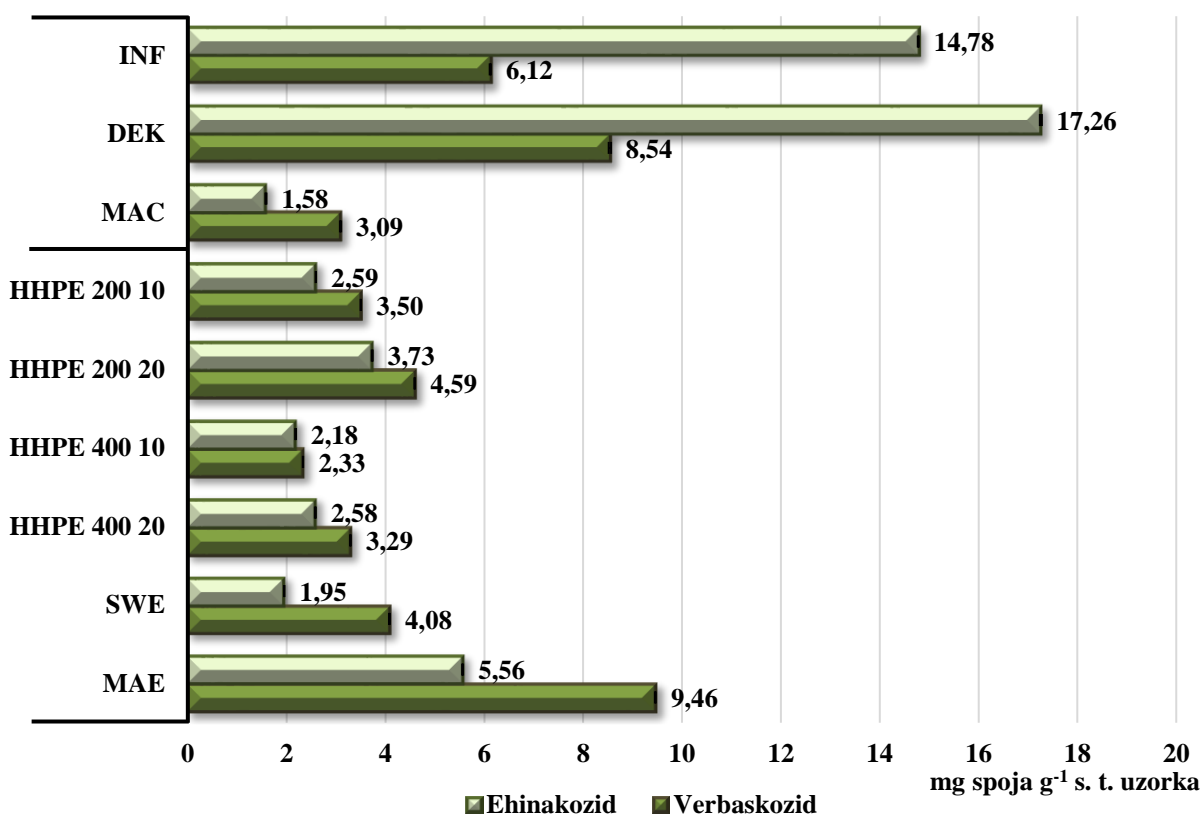
Što se tiče antioksidacijskog kapaciteta, bez obzira na metodu određivanja (ABTS ili DPPH metoda), najveće vrijednosti uočene su kod ekstrakata dobivenih konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, što je i za očekivati s obzirom da su ti uzorci imali i najviše vrijednosti udjela polifenola. Također, vidljivo je da postoji značajna razlika u antioksidacijskom kapacitetu među ispitanim ekstraktima ovisno o primijenjenoj tehnici. Kod ekstrakata dobivenih konvencionalnim tehnikama uočene su više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom, dok kod inovativnih DPPH metodom. Razlika u rezultatima antioksidacijskog kapaciteta leži u činjenici da su primijenjene dvije različite metode kod kojih se za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste različiti slobodni radikali što znači da

dolazi do drugačijih reakcija između slobodnih radikala i antioksidanasa u uzorcima, što ponajviše ovisi o strukturi polifenolnih spojeva (Kopjar i sur., 2013).

Što se tiče ekstrakata dobivenih konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, vidljivo je da najveći antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom pokazuje infuzija (INF = 0,189 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka), a zatim slijede dekoka (DEK = 0,176 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka) te macerat (MAC = 0,149 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka). Isti poredak utvrđen je određivanjem antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom, (INF (0,179 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka) > DEK (0,168 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka) > MAC (0,140 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka)). Dobiveni rezultati su ponovno potvrdili utjecaj topline i trajanja ekstrakcije na prinos bioaktivnih spojeva svrstavajući infuziju u kategoriju ekstrakata bogatih polifenolnim spojevima te visokog antioksidacijskog kapaciteta. Isto potvrđuju i Katsube i suradnici (2009) koji su utvrdili da su polifenolni spojevi i njihova antioksidacijska svojstva u biljnim ekstraktima stabilni do temperature od 70 do 80 °C, dok se na višim temperaturama počinju degradirati i gube svoju aktivnost. U usporedbi s drugim ekstraktima dobivenima inovativnim tehnikama ekstrakcije, uzorak dobiven ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pokazuje najviši antioksidacijski kapacitet za obje metode određivanja (MAE = 0,168 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka za ABTS metodu i MAE = 159 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka za DPPH metodu), što se može pripisati višem udjelu polifenolnih spojeva u ekstraktu. Zatim slijedi uzorak dobiven ekstrakcijom subkritičnom vodom (SWE = 0,124 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka za ABTS metodu te 0,153 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka za DPPH metodu), dok su antioksidacijski kapaciteti uzoraka dobivenih ekstrakcijom visokom hidrostatskim tlakom najniži te se kreću u rasponu od 0,102 – 0,115 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka za ABTS te 0,124 – 0,148 mmol Trolox-a g⁻¹ s. t. uzorka za DPPH metodu, uz manja odstupanja.

4.3.4. Određivanje udjela pojedinačnih polifenola u ekstraktima trave ive primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-PDA) određeni su pojedinačni polifenolni spojevi u ekstraktima dobivenim inovativnim i konvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Rezultati su prikazani u tablici 12 i izraženi kao mg polifenolnog spoja g⁻¹ s. t. uzorka.



Slika 12. Udjeli pojedinačnih polifenolnih spojeva (mg g⁻¹ s. t. uzorka) u ekstraktima trave ive dobivenim konvencionalnim i inovativnim tehnikama ekstrakcije (INF – infuzija; DEK – dekokcija, MAC – maceracija, HHPE – ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom 200 ili 400 MPa, 10 ili 20 minuta; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)

Iz rezultata je vidljivo kako su različite tehnike ekstrakcije rezultirale različitim udjelima ekstrahiranih polifenolnih spojeva trave ive, od kojih su najzastupljeniji ehinakozid i verbaskozid (glikozidi kafeinske kiseline iz skupine fenilpropanoide). Također, visoki udjel verbaskozida utvrđen je i u drugim vrstama roda *Teucrium* kao što su *T. canadense* i *T. chamaedrys* (Lin i sur., 2009). Uvidom u rezultate prikazane na slici 12 uočeno je kako je konvencionalnim tehnikama ekstrakcije ekstrahirano više ehinakozida za razliku od inovativnih tehnika ekstrakcije u čijim ekstraktima prednjači verbaskozid. Kao što je i prije utvrđeno, infuzijom i dekokcijom ekstrahirano je vrlo visoki udio ukupnih polifenola. U infuziji je utvrđeno čak 14,78 mg ehinakozida g⁻¹ s. t. uzorka, što je 36 % udjela ukupnih polifenola, te 6,12 mg verbaskozida g⁻¹ s. t. uzorka (15 % udjela ukupnih polifenola). U dekoktu je utvrđeno 17,26 mg ehinakozida g⁻¹ s. t. uzorka (48 % udjela ukupnih polifenola) i 8,54 mg verbaskozida g⁻¹ s. t. uzorka (24 % udjela ukupno ekstrahiranih polifenola). Dugotrajna ekstrakcija na sobnoj

temperaturi rezultirala je znatno nižim udjelom polifenolnih spojeva u maceratu. Što se tiče inovativnih tehnika ekstrakcije, ponovno se pokazalo da lokalizirano djelovanje temperature i tlaka u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima uzrokuje bržu selektivnu migraciju polifenola iz matriksa uzorka, budući da je ekstrahirano čak 9,46 mg verbaskozida g⁻¹ s. t. uzorka i 5,56 mg ehinakozida g⁻¹ s. t. uzorka, što ukazuje na visoki potencijal primjene mikrovalova u ekstrakciji ciljanih polifenolnih spojeva trave ive. Ekstrakcijom subkritičnom vodom ekstrahirano je tek 1,95 mg ehinakozida g⁻¹ s. t. uzorka te 4,08 mg verbaskozida g⁻¹ s. t. uzorka, dok je ekstrakcija pri 200 MPa i 20 minuta rezultirala najvećim prinosom oba polifenolna spoja među ekstraktima dobivenim primjenom visokog hidrostatskog tlaka (3,73 mg ehinakozida g⁻¹ s. t. uzorka i 4,59 mg verbaskozida g⁻¹ s. t. uzorka).

4.4. KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA S INKAPSULIRANIM EKSTRAKTOM TRAVE IVE

4.4.1. Fizikalno- kemijska karakterizacija liposoma (određivanje veličine, indeksa polidisperzije i zeta potencijala liposoma)

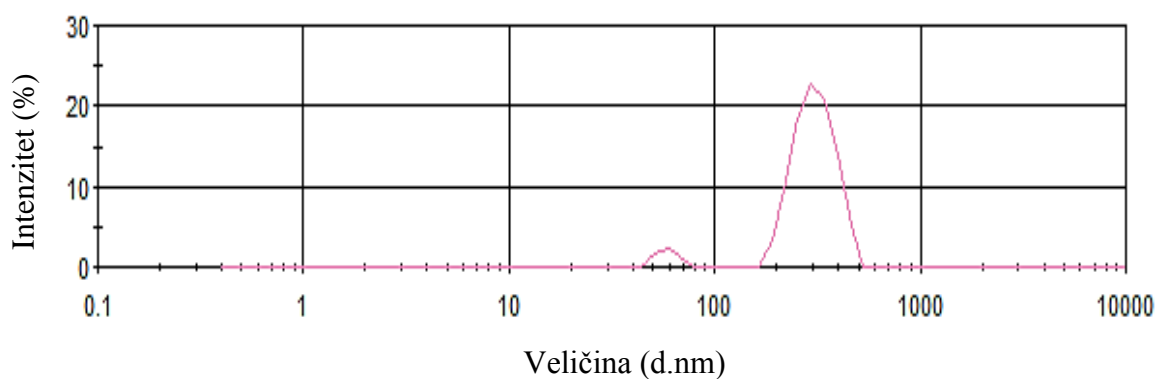
Tablica 8. Veličina, indeks polidisperzije i zeta potencijal liposoma

	VELIČINA (nm)	INDEKS POLIDISPERZIJE	ZETA POTENCIJAL (mV)
PRAZNI LIPOSOMI	316,13 ± 6,35	0,369 ± 0,04	-31,23 ± 0,54
LIPOSOMI 1:5	231,40 ± 11,47	0,367 ± 0,03	-19,90 ± 1,44
LIPOSOMI 1:10	362,83 ± 3,35	0,535 ± 0,07	-35,93 ± 1,39
LIPOSOMI 1:20	326,23 ± 14,08	0,335 ± 0,02	-23,03 ± 0,31

Izmjereni su veličina, indeks polidisperzije (PDI) i zeta potencijal praznih liposoma i liposoma s inkapsuliranim ekstraktom trave ive s različitim omjerima ekstrakta i fosfolipida. Rezultati su prikazani u tablici 8.

Veličina čestica u koloidnom sustavu izravno utječe na svojstva kao što su stabilnost i bioraspodivnost bioaktivnih spojeva inkapsuliranih liposomima. Veličina praznih liposoma iznosi 316,13 ± 6,35 nm, dok se veličina liposoma s inkapsuliranim ekstraktom kretala od 231,40 ± 11,47 nm za liposome 1:5 do 362,83 ± 3,35 nm za liposome 1:10. Na temelju

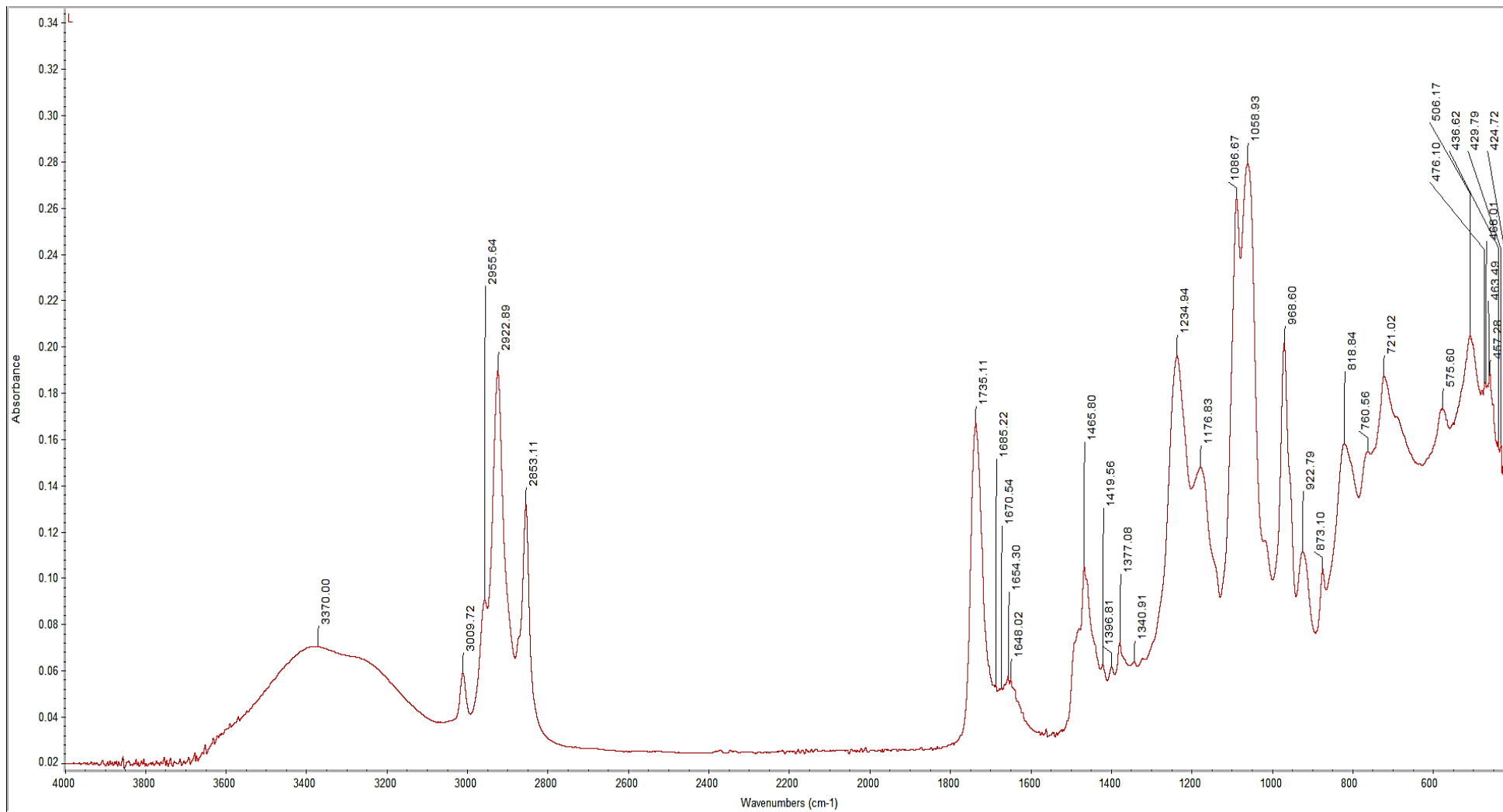
dobivenih rezultata vidljivo je da je inkapsulacija ekstrakta trave ive rezultirala većim liposomima, s obzirom da su prazni liposomi manje veličine u odnosu na liposome s inkapsuliranim ekstraktom, osim u slučaju liposoma 1:5. Slične rezultate dobili su i Gibis i suradnici (2016) koji su izvijestili o većim česticama liposoma nakon inkapsulacije polifenolnog ekstrakta sjemenki grožđa. Dobiveni rezultati mogu se objasniti smještanjem bioaktivnih spojeva ekstrakta unutar vodene jezgre, ali i između dvoslojnih membrana liposoma. Indeksom polidisperzije (PDI) određuje se raspodjela veličina čestica i homogenost sustava. Sustav čiji je indeks polidisperzije u rasponu od 0 do 0,5 smatra se monodisperznim i homogenim (Balanč i sur., 2016). Prema Luo i suradnicima (2020) manja veličina čestica i manji PDI ukazuju na homogeniji i stabilniji uzorak liposoma. Iako je sustav 1:5 imao najmanje čestice, liposomi 1:20 pokazali su relativno homogenu raspodjelu veličine (slika 13).



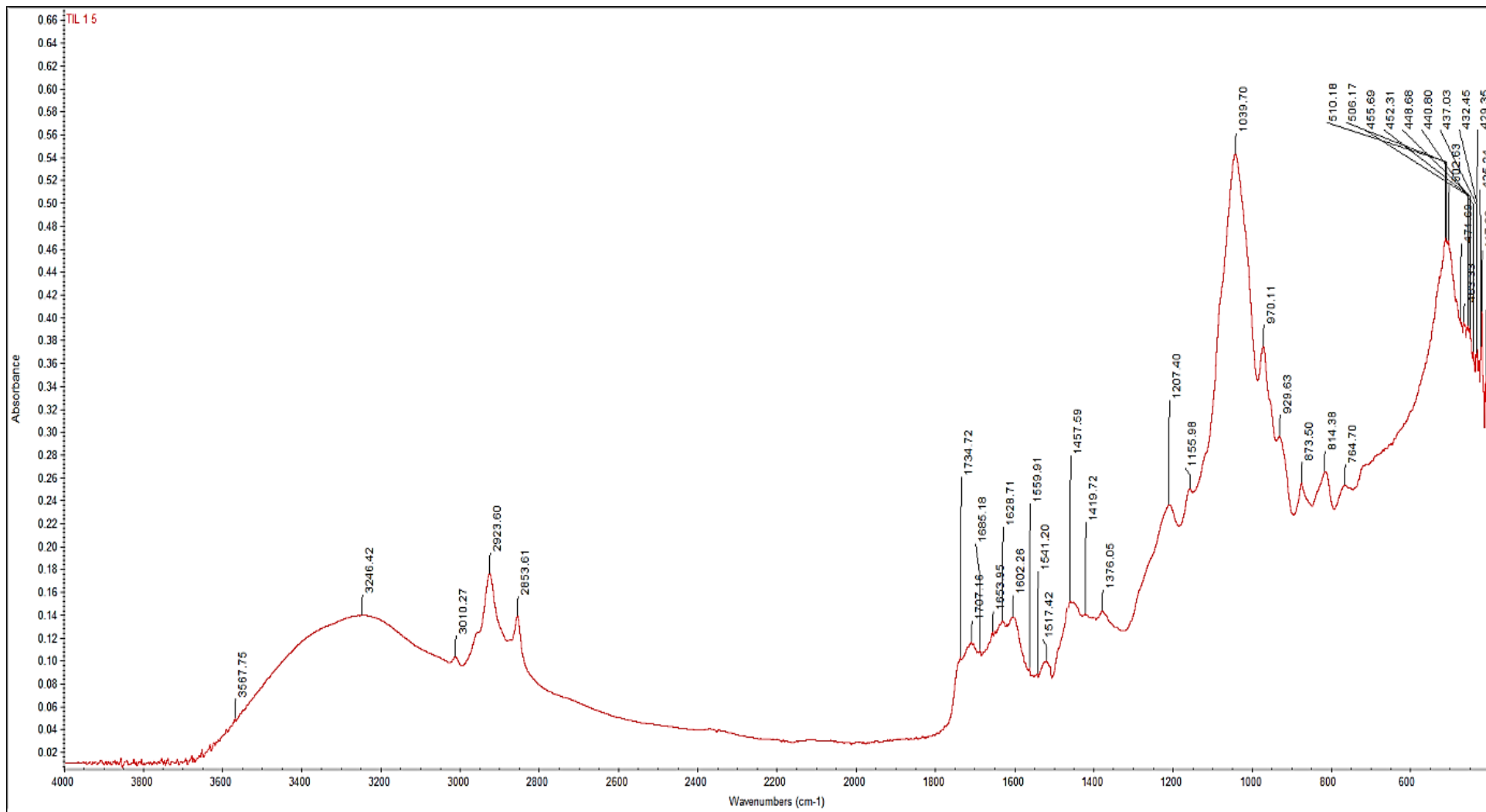
Slika 13. Raspodjela veličine čestica liposoma 1:20 prema intenzitetu (indeks polidisperzije)

Zeta potencijal je parametar koji predstavlja naboj na površini čestica. Korelira sa stabilnošću koloidnih suspenzija, stoga visoka apsolutna vrijednost zeta potencijala ukazuje na stabilniji sustav (Mateos i sur., 2019). Zeta potencijal liposoma kretao se od $-35,95 \pm 1,39$ mV za liposome 1:10 do $-19,90 \pm 1,44$ mV za liposome 1:5. Negativni zeta-potencijal nastaje zbog prisutnosti fosfatnih skupina (PO_4^{3-}) u fosfolipidima. Lin i suradnici (2018) navode da kada je zeta potencijal <-30 mV ili >30 mV, kao što je u slučaju liposoma 1:10, tada može osigurati dovoljnu odbojnu silu za održavanje stabilnog sustava. Međutim potencijal blizu 20 mV (pozitivno ili negativno) sugerira nisku stabilnost koloidne suspenzije (Machado i sur., 2018) što je u slučaju liposoma 1:5 i 1:20.

4.4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)



Slika 14. FTIR spektar praznih liposoma



Slika 15. FTIR spektar liposoma 1:20

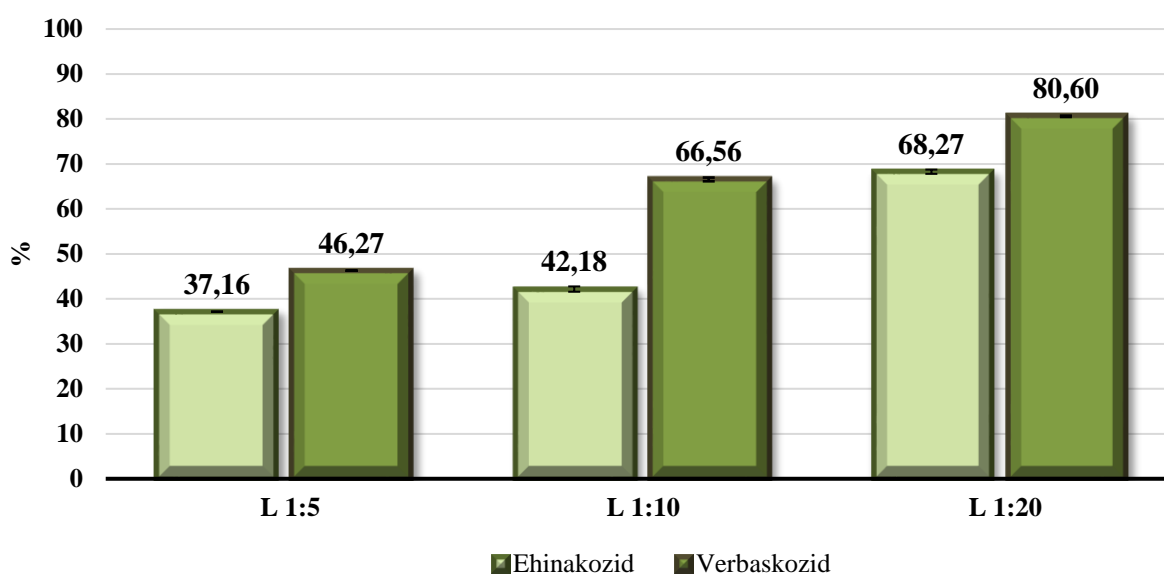
FTIR spektroskopija korištena je za identificiranje funkcionalnih skupina liposoma, kao i za procjenu mogućih promjena u strukturi liposoma nakon inkapsulacije polifenolnog ekstrakta trave ive. Slike 14 i 15 predstavljaju FTIR spektre praznih liposoma, odnosno liposoma s inkapsuliranim polifenolnim ekstraktom (omjer ekstrakta i fosfolipida 1:20).

Na spektru koji se odnosi na prazne liposome (slika 14), široki pik na 3370 cm^{-1} ukazuje na prisutnost amino skupine lipida i rasteznih vibracija N-H veza, dok raspon od 3100 do 2800 cm^{-1} odgovara metilnim grupama, točnije, funkcionalne skupine alkana protežu se na valnim duljinama $2955,64\text{ cm}^{-1}$ (simetrične rastezne vibracije CH_2 skupine alkil lanaca), $2922,89\text{ cm}^{-1}$ (asimetrične rastezne vibracije CH_2 skupina alkil lanaca), i $1465,80\text{ cm}^{-1}$ (vibracije svijanja CH_2 skupina). Pik na $1735,11\text{ cm}^{-1}$ nastao je zbog C=O rasteznih vibracija karbonilnih skupina, dok se pik na $1058,93\text{ cm}^{-1}$ odnosi na asimetrične vibracije istezanja hidroksilne grupe. Fosfatna skupina lipida pokazuje apsorpcijske pikove kao posljedicu rasteznih vibracija PO_2 skupina na $1176,93\text{ cm}^{-1}$ te asimetrične vibracije istezanja PO_2 na $1234,94\text{ cm}^{-1}$. Dobiveni rezultati u skladu su s podacima za FTIR spektar praznih liposoma koje su objavili Rezaei Erami i suradnici (2019).

Što se tiče FTIR spektra liposoma 1:20 (slika 15) vidljivo je da je prisutno nekoliko karakterističnih apsorpcijskih vrpci na valnim duljinama $3246,42\text{ cm}^{-1}$, $2923,60\text{ cm}^{-1}$, $2853,61\text{ cm}^{-1}$, $1602,26\text{ cm}^{-1}$ i $1039,70\text{ cm}^{-1}$. Apsorpcijski pik na $3246,42\text{ cm}^{-1}$ povezan je s rasteznom vibracijama N-H veza, pikovi $2923,60\text{ cm}^{-1}$ i $2853,61\text{ cm}^{-1}$ rezultati su asimetričnih rasteznih vibracija CH_2 skupina alkilnog lanca, a pikovi $1602,26\text{ cm}^{-1}$ i $1039,70\text{ cm}^{-1}$ povezani su s aromatskim skupinama i istezanjem C-O veza. Usporedbom FTIR spektra koji se odnosi na prazne liposome i FTIR spektra dobivenog za liposome s inkapsuliranim polifenolnim ekstraktom mogu se primijetiti određene promjene. Kao što je vidljivo, pikovi između 3100 cm^{-1} i 2800 cm^{-1} te 1800 cm^{-1} i 1300 cm^{-1} su u apsorpcijskom spektru liposoma s inkapsuliranim ekstraktom promijenili intenzitet i oblik. Apsorpcijski pik na valnoj duljini $1058,93\text{ cm}^{-1}$ (alkoholna skupina) u praznim liposomima pomaknuo se na druge valne duljine u spektru za liposome s inkapsuliranim ekstraktom. Također, pik na $1234,94\text{ cm}^{-1}$ (fosfatna skupina) je u liposomima 1:20 nestao, dok je pik koji se odnosi na valnu duljinu $1176,83\text{ cm}^{-1}$ pomaknut na $1155,98\text{ cm}^{-1}$ u liposomima 1:20. Ovi rezultati mogu se pripisati povećanju stupnja hidratacije fosfolipidne hidrofilne glave i broja vodikovih veza između hidroksilnih skupina ekstrakta i PO_2 skupine (Ciešlik-Boczula i sur., 2012). Isto potvrđuju i Cagnasso i suradnici (2017) koji navode da inkapsulacija polifenolnih ekstrakata u liposome dovodi do promjene rastezne vibracije fosfatne grupe, kako u asimetričnim (oko 1200 cm^{-1}) tako i u simetričnim vibracijama (oko 1035 cm^{-1}). Nadalje, pik na $1735,11\text{ cm}^{-1}$, koji označava karbonilnu skupinu, pomaknut je

prema nižim valnim duljinama na $1734,72\text{ cm}^{-1}$ te je manjeg intenziteta što bi moglo ukazivati na interakciju između hidroksilnih skupina ekstrakta i karbonilne grupe fosfolipida preko vodikovih veza (Ciešlik-Boczula i sur., 2012). Iako određene razlike u FTIR spektrima sugeriraju na prisutnost polifenola u liposomima, nepostojanje novih apsorpcijskih pikova u FTIR spektru za liposome 1:20, navodi na zaključak da je riječ o slabij fizičkoj interakciji polifenolnih spojeva i fosfolipida.

4.4.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenolnih spojeva liposomima



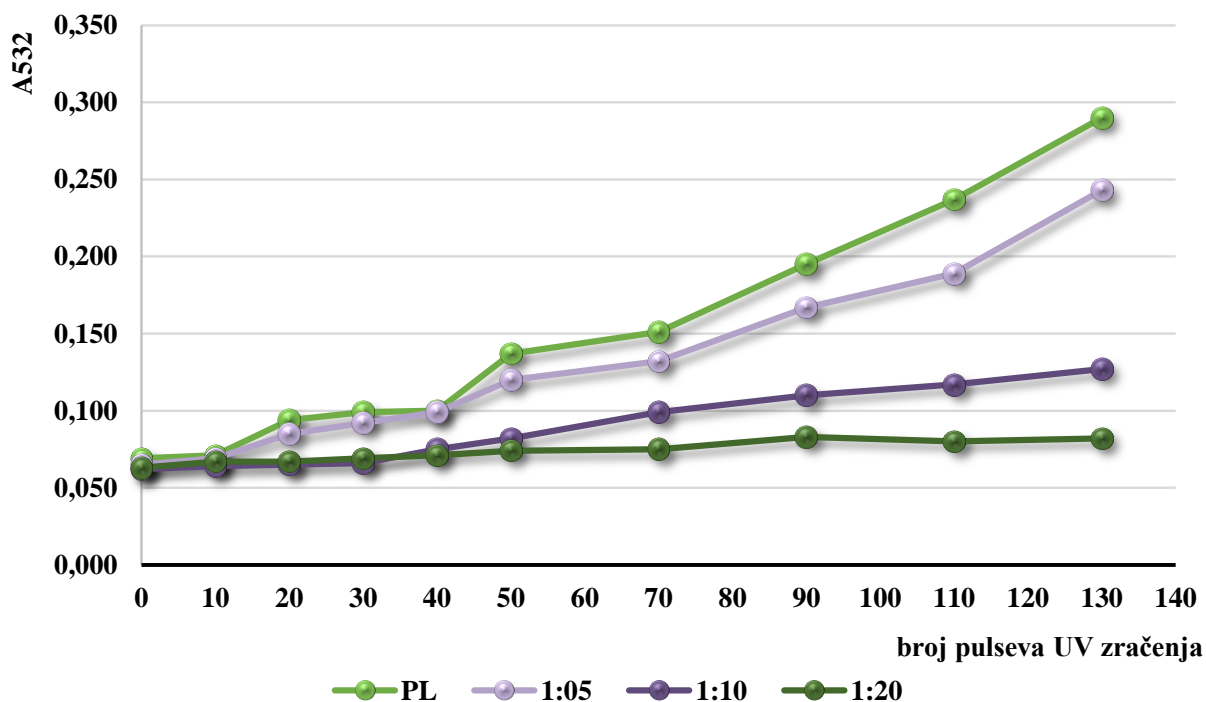
Slika 16. Inkapsulacijska učinkovitost (%) ehinakozida i verbaskozida u liposomima pripremljenim s različitim omjerima ekstrakta i fosfolipida

Učinkovitost inkapsulacije jedan je od glavnih pokazatelja efikasnosti liposoma u očuvanju i održavanju bioaktivnih spojeva unutar lipidne strukture. Inkapsulacijska učinkovitost (%) polifenolnih spojeva trave ive u česticama liposoma određena je na HPLC uređaju opremljenom UV detektorom na 320 nm, a predstavlja postotak inkapsuliranih ehinakozida i verbaskozida u česticama liposoma s različitim omjerima ekstrakta i fosfolipida. Slika 16 prikazuje dobivene rezultate.

Uvidom u rezultate prikazane na slici 16 vidljivo je da se inkapsulacijska učinkovitosti za ehinakozid kreće u rasponu od 37,16 % do 68,27 %, dok za verbaskozid od 46,27 % do 80,60 % što znači da se verbaskozid bolje inkapsulirao u čestice liposoma u odnosu na ehinakozid u

sva tri pripremljena sustava. Najveći stupanj inkapsulacije pokazao je sustav 1:20 (80,60 %) a zatim slijede sustavi 1:10 (66,56 %) i 1:5 (46,27 %). Isti trend uočen je i kod ehinakoziida gdje je inkapsulacijska učinkovitost sustava 1:20 iznosila 68,27 %, dok sustava 1:5 37,16 %. Usporedbom učinkovitosti inkapsulacije verbaskozida i ehinakoziida vidljivo je kako postoje značajne razlike između sustava pripremljenih s različitim omjerima liofiliziranog ekstrakta i fosfolipida. Uočeno je kako su sustavi pripremljeni s većim udjelom ekstrakta rezultirali liposomima s manjom inkapsulacijskom učinkovitošću. Isto potvrđuju i rezultati rada Sinico i suradnika (2008) u kojem je sustav pripremljen s manjim udjelom verbaskozida rezultirao većom inkapsulacijskom učinkovitošću. Osim toga, inkapsulacijska učinkovitost dobivena ovim istraživanjem znatno je veća od rezultata inkapsulacijske učinkovitosti verbaskozida (30 %) inkapsuliranog liposomima, objavljenog u radu Isacchi i suradnika (2016). Iako se inkapsulacijska učinkovitost od 80,6 %, koliko je najviše dobiveno u ovom radu, može smatrati zadovoljavajućom, pregledom dostupne literature uočeno je kako izbor tehnike za pripremu liposoma treba prilagoditi bioaktivnoj tvari koja se inkapsulira kako bi se postigli viši stupnjevi inkapsulacijske učinkovitosti. Potvrda tome su rezultati rada Machado i suradnika (2018) koji su polifenolni ekstrakt dobiven iz mikroalge *Spirulina* inkapsulirali liposomima tehnikom evaporacije obrnutih faza, čime su uspjeli formirati liposome s visokim stupnjem inkapsulacijske učinkovitosti, čak 97,35 % za liposome pripremljene s rižinim lecitinom i 88,28 % za liposome sa sojinim lecitinom. Također, primijećeno je kako integracija određenih postupaka poput mikrofluidizacije ili ultrazvuka u konvencionalne tehnike pripreme liposoma, može pridonijeti povećanju inkapsulacijske učinkovitosti. U prilog tome idu rezultati rada García-Toledo i suradnika (2018) u kojem je primjenom mikrofluidizacije inkapsulirano čak 88 % bakteriocina, dok su Machado i suradnici (2014) uočili da liposomi koji su bili podvrgnuti homogenizaciji imali više vrijednosti inkapsulacijske učinkovitosti (90%), u usporedbi s liposomima tretiranim ultrazvukom (79%). Međutim, da bi se formirali liposomi s visokim stupnjem inkapsulacijske učinkovitosti, osim izbora tehnike za pripremu liposoma, u obzir je potrebno uzeti i prirodu bioaktivnih tvari (njihova lipofilnost ili hidrofilitnost i topljivost), prirodu fosfolipida (stupanj zasićenosti i sastav masnih kiselina), koncentraciju i vrstu stabilizatora, kao što je kolesterol te okolišne uvjete poput temperature i pH.

4.4.4. Određivanje antioksidacijske učinkovitosti inkapsuliranog ekstrakta trave ive tiobarbiturnom kiselinom (TBARS test)



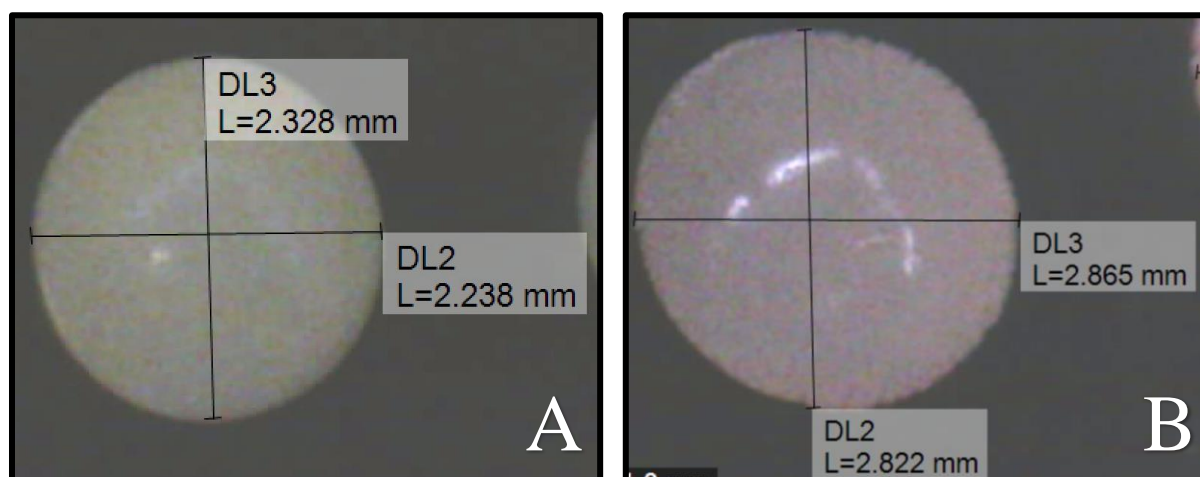
Slika 17. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta trave ive TBARS testom

TBARS test korišten je za kvantifikaciju lipidne peroksidacije. Prazni liposomi (PL) i liposomi s različitim omjerom inkapsuliranog ekstrakta trave ive i lipida izloženi su UV zračenju. Tiobarbiturna kiselina reagira s malondialdehidom, produktom razgradnje lipidnog hidroperoksida što rezultira ružičastim obojenjem koje se mjeri spektrofotometrijski na 532 nm (Balanč i sur., 2015). Rezultati TBARS testa prikazani su na slici 17.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su prazni liposomi (kontrola) izloženi UV zračenju pokazali najviše vrijednosti reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline što ukazuje na znatnu lipidnu peroksidaciju koja je postupnim povećanjem broja pulseva UV zračenja postala sve izraženija. To se može objasniti činjenicom da membrana liposoma sadrži nezasićene dvostruke veze, sklone oksidativnoj degradaciji praćenoj rupturom nepolarnih ugljikovodičnih lanaca, čime se izravno utječe na smanjenje stabilnost lipidnog dvosloja (Huang i sur., 2019). Polifenolni spojevi dobro su poznati po svojim antioksidacijskim svojstvima, što potvrđuju i dobiveni rezultati s obzirom da se inkapsulacijom polifenolnih spojeva liposomima značajno smanjila peroksidacija lipida izazvana UV zračenjem. Smatra se da hidrosilne skupine polifenola smještene blizu dvostrukih veza polinezasićenih masnih kiselina mogu modulirati

lipidnu peroksidaciju (Fabris i sur., 2008). Uspoređujući međusobno liposome s različitim omjerima inkapsuliranog ekstrakta i fosfolipida očekivalo bi se da će sustav 1:5 pokazati najveću antioksidacijsku aktivnost budući da je pripremljen s najvećom koncentracijom inkapsuliranog ekstrakta, međutim, kako je već prije spomenuto, sustav 1:20 pokazao je najveću inkapsulacijsku učinkovitost među ispitanim sustavima za oba polifenolna spoja, ehinakozid (60,27 %) i verbaskozid (80,60 %), zbog čega je i TBARS vrijednost za ovaj sustav očekivano najniža. Ovi podaci ukazuju na visoki antioksidacijski potencijal ehinakozida i verbaskozida u inhibiciji stvaranja malondialdehida te zaštititi liposoma od peroksidacije. Također, pregledom dostupne literature uočeno je kako su se i drugi polifenoli poput kvercetina, kempferola i luteolina (Huang i sur., 2017), kao i resveratrola (Balanč i sur., 2015), pokazali vrlo učinkovitim u uklanjanju visoke razine radikala.

4.4.5. Određivanje morfoloških karakteristika liposoma obloženih alginatom i pektinom



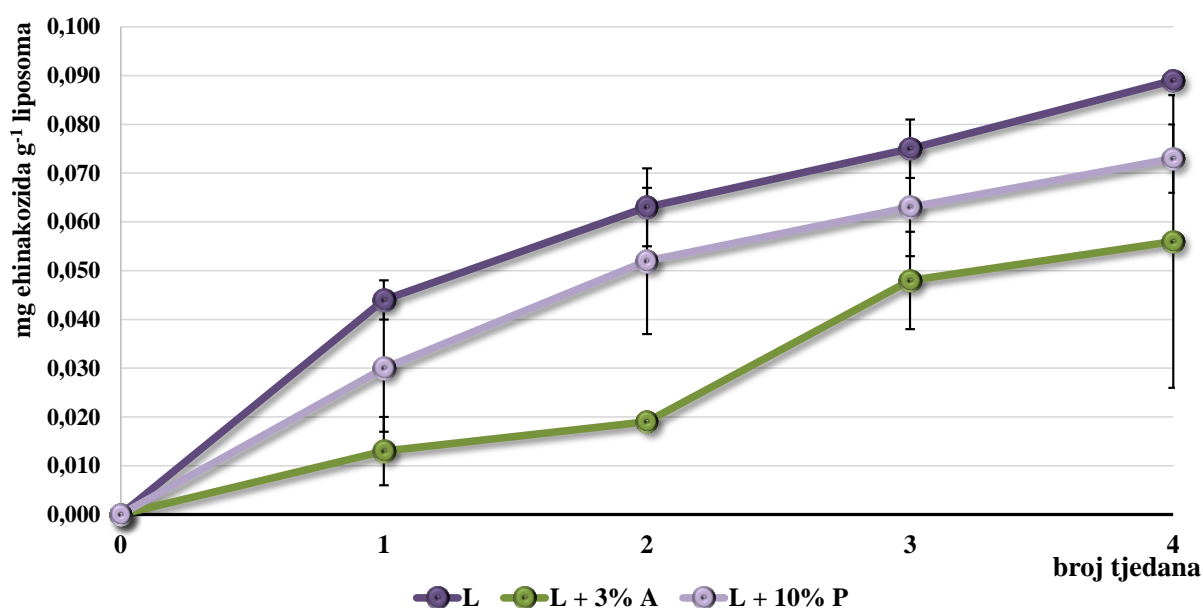
Slika 18. Mikroskopske slike liposoma obloženih alginatom (A) i pektinom (B)

Morfološke karakteristike, s ciljem određivanja oblika i veličine liposoma obloženih polimerom, ispitane su snimanjem čestica svjetlosnim mikroskopom uz odgovarajuće povećanje. Dobivene mikroskopske slike liposoma obloženih alginatom (A) i pektinom (B) prikazane su na slici 18.

Promatranjem morfoloških karakteristika liposoma obloženih s dva različita polimera uočene su određene razlike u promjeru, strukturi i obliku čestica. Vidljivo je kako su liposomi obloženi alginatom pravilnog oblika te vrlo sferični s prosječnim promjerom 2,2 mm. Dobru, iako nešto manju sferičnost i pravilnost oblika, pokazali su liposomi obloženi pektinom.

Također, iste čestice su većeg promjera ($L=2,8$ mm) u odnosu na liposome obložene alginatom što se može pripisati manje homogenoj otopini nosača za inkapsulaciju i korištenjem igle većeg promjera. Nadalje, primjenom svjetlosnog mikroskopa uočeno je kako površina liposoma obloženih pektinom nije glatka kao kod liposoma obloženih alginatom, već hrapava uz određene nepravilnosti. Spomenuta hrapavost površine liposoma obloženih pektinom potvrđena je primjenom SEM mikroskopije u istraživanju Lee i suradnika (2008), dok su Balanč i suradnici (2016) primjenom iste tehnologije snimili glatku površinu liposoma obloženih alginatom.

4.4.6. Određivanje učinkovitosti zadržavanja polifenolnih spojeva u liposomima te u liposomima obloženim alginatom i pektinom



Slika 19. Profil otpuštanja ehinakozida (mg ehinakozida g⁻¹ liposoma) iz liposoma (L), liposoma obloženih 3 % alginatom (L + 3 % A) i liposoma obloženih 10 % pektinom (L + 10 % P) u periodu od četiri tjedna

S obzirom da je sustav liposoma 1:20 pokazao najviši stupanj inkapsulacijske učinkovitosti, isti je korišten u ispitivanju profila otpuštanja ehinakozida i verbaskozida iz liposoma (L), liposoma obloženih 3 % alginatom (L + 3 % A) i liposoma obloženih 10 % pektinom (L + 10 % P) u vremenskom razdoblju od četiri tjedna izuzimanjem alikvota kave u koju su liposomi dodani. Prisutnost polifenolnih spojeva u uzorcima kave ispitana je primjenom

tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Analiza je pokazala kako se verbaskozid u promatranom razdoblju nije otpustio iz niti jednog sustava liposoma, a rezultati za otpuštanje ehinakozida prikazani su na slici 19 i izraženi kao mg ehinakozida g^{-1} liposoma.

Kao što je prikazano na slici 19, sva tri sustava pokazala su kontinuirano otpuštanje ehinakozida u vremenskom razdoblju od četiri tjedna. U usporedbi s liposomima koji nisu dodatno obloženi polisaharidnim polimerom, vidljivo je da je prisutnost slojeva pektina i alginata na površini liposoma predstavljala određenu prepreku za otpuštanje ehinakozida iz čestica budući da ga je iz sustava L + 3% A i L + 10% P u kavu otpušteno manje. Nakon prvog tjedna skladištenja, najviše ehinakozida se otpustilo iz čestica liposoma, čak $0,044 \text{ mg } g^{-1}$, zatim nešto manje iz liposoma obloženih 10 % pektinom, $0,030 \text{ mg } g^{-1}$, dok ga se iz liposoma obloženih 3 % alginatom otpustilo najmanje, tek $0,013 \text{ mg } g^{-1}$. Navedeni poredak sustava u otpuštanju zadržan je do kraja skladištenja uzoraka kave. Uočeno je kako se iz sustava L svakim tjednom u prosjeku otpustilo 15-20 mg ehinakozida g^{-1} liposoma to jest ukupno $0,089 \text{ mg } g^{-1}$, dok se iz liposoma obloženih 10 % pektinom (L + 10 % P) tjedno otpustilo 10 mg ehinakozida g^{-1} liposoma, odnosno $0,073 \text{ mg } g^{-1}$ nakon četiri tjedna skladištenja. Rezultati su u skladu s istraživanjem Feng i suradnika (2019) koji su potvrdili efikasnost zadržavanja bioaktivnih spojeva u liposomima obloženima niskometiliranim pektinom dodanim u sok od naranče. U periodu od 20 dana u sok naranče otpustilo se znatno manje resveratrola i epigalokatehin galata iz liposoma obloženih niskometiliranim pektinom za razliku od liposoma koji nisu bili obloženi polimerom. Također, utvrđeno je da su visoka stabilnost tijekom skladištenja te kontinuirani profil otpuštanja bioaktivnih spojeva usko povezani s gelacijom i toplinskom reverzibilnošću pektina, što je vjerojatno i razlog povoljnijeg profila otpuštanja ehinakozida iz sustava L+10 % P u odnosu na sustav L u ovom istraživanju. Ipak, slika 19 prikazuje kako se sustav liposoma obloženih 3 % alginatom pokazao najučinkovitiji u zadržavanju ehinakozida u liposomima s obzirom da ga se u periodu od četiri tjedna otpustilo najmanje, ukupno $0,056 \text{ mg } g^{-1}$. Na visoku učinkovitost zadržavanja polifenolnih spojeva u liposomima obloženim alginatom ukazali su i Balanč i suradnici (2016) koji su uočili da je razina otpuštanja resveratrola iz liposoma obloženih alginatom bila niža u odnosu na druge pripremljene sustave. Osim pektina i alginata, učinkovitim u zadržavanju bioaktivnih spojeva unutar strukture liposoma pokazali su se i guma arabika (Dag i sur., 2019), guar guma (Pu i sur., 2019), kitozan (Cuomo i sur., 2018), celuloza (Smistad i sur., 2017) i izolati proteina sirutke (Frenzel i sur., 2015).

5. ZAKLJUČCI

1. Trava iva (*Teurium montanum* L.) predstavlja bogat izvor prehrambenih vlakana, posebice onih netopljivih, koja čine više od polovicu ukupne suhe tvari. Ostali sastojci suhe tvari, poput mineralnih tvari, proteina i masti, zastupljeni su u nižim udjelima, karakterističnima za rod *Teucrium*. Najzastupljenije mineralne tvari u travi ivi su kalcij, kalij, a zatim slijede željezo, magnezij, sumpor i fosfor.
2. Antocijani su najzastupljeniji pigmenti u travi ivi, a zatim slijede ukupni klorofili, među kojima je dominantan klorofil a. Karotenoidi su najmanje zastupljeni pigmenti.
3. Konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, posebice infuzijom, dobiveni su ekstrakti s većim ekstrakcijskim prinosom u odnosu na ekstrakte dobivene inovativnim tehnikama.
4. Primjena topline rezultirala je većim udjelom ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenim konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, budući da je infuzijom i dekokcijom ekstrahirano više polifenola u odnosu na maceraciju provedenu na sobnoj temperaturi.
5. Kod inovativnih tehnika ekstrakcije, primjena mikrovalova pokazala se najučinkovitijom u ekstrakciji polifenolnih spojeva, a zatim slijedi ekstrakcija subkritičnom vodom. Iako se ekstrakcijom visokim hidrostatskim tlakom ekstrahiralo najmanje polifenolnih spojeva, kombinacija ekstrakcijskih uvjeta od 200 MPa i 10 minuta pokazala se najučinkovitijom.
6. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata određen ABTS i DPPH metodama u skladu je s udjelima ukupnih polifenolnih spojeva određenih u ekstraktima.
7. Najzastupljeniji polifenolni spojevi trave ive su ehinakozid i verbaskozid.
8. Sustavi pripremljeni s većim udjelom ekstrakta rezultirali su liposomima s manjom inkapsulacijskom učinkovitošću. Verbaskozid se uspješnije inkapsulirao u čestice liposoma u odnosu na ehinakozid, a sustav liposoma 1:20 pokazao je relativno homogenu raspodjelu veličine čestica te najviši stupanj inkapsulacijske učinkovitosti za oba polifenolna spoja što je potvrđeno i FTIR spektroskopijom.
9. Ehinakozid i verbaskozid pokazali su visoki antioksidacijski potencijal u inhibiciji stvaranja malondialdehida te zaštititi liposoma od peroksidacije.
10. Oblaganje liposoma polimerima pokazalo se uspješnima u zadržavanju polifenolnih spojeva unutar strukture liposoma, pri čemu su liposomi obloženi alginatom imali sporiji profil otpuštanja polifenola u kavu u odnosu na liposome obložene pektinom. Također, u odnosu na liposome obložene pektinom, liposomi obloženi alginatom bili su pravilnog oblika i glatke površine.

6. LITERATURA

Aires, A. (2017) Phenolics in foods: extraction, analysis and measurements. U: Phenolic compounds - natural sources, importance and applications, (Soto-Hernandez, M., Palma Tenango, M., Garcia-Mateos, M.R., ured.), InTech, London/UK, str. 61 – 88.

Anonymous 1 (2020) <<https://www.krenizdravo.hr/zdravlje/alternativna-medicina/biljna-ljekarna/trava-iva-ljekovita-svojstva-i-recept-za-tinkuru-i-caj>> Pristupljeno 10. svibnja 2020.

Akgün, D., Gültekin-Özgüven, M., Yüceetepe, A., Altin, G., Gibis, M., Weiss, J., Özçelik, B. (2020) Stirred-type yoghurt incorporated with sour cherry extract in chitosan-coated liposomes. *Food Hydrocolloid.* **101**, 105532.

Altin, G., Gültekin-Özgüven, M., Ozcelik, B. (2018) Liposomal dispersion and powder systems for delivery of cocoa hull waste phenolics via Ayran (drinking yoghurt): Comparative studies on in-vitro bioaccessibility and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloid.* **81**, 364–370.

AOAC (1990a) Moisture in animal feed - AOAC method 930.15. Official methods of analysis of AOAC international, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.

AOAC (1990b) Fat (crude) or ether extract in animal feed - AOAC method 920.39. Official methods of analysis of AOAC international, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.

AOAC (2012) Insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods - AOAC- method 2011.25. Megazyme International Ireland Ltd., Bray, County Wicklow, Ireland.

Arriola, N. D. A., Chater, P. I., Wilcox, M., Lucini, L., Rocchetti, G., Dalmina, M., Dalmina, M., Pearson, P. J., de Mello Castanho Amboni, R. D. (2018) Encapsulation of Stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation – Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food Chem.* **275**, 123 – 134.

Ariyaratna, I. R., Karunaratne, N. (2015) Use of chickpea protein for encapsulation of folate to enhance nutritional potency and stability. *Food Bioprod. Process.* **95**, 76–82.

Aspé, E., Fernández, K. (2011) The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Ind. Crop. Prod.* **34**, 838–844.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426–436.

Azwanida, N. N. (2015) A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat. Plants* **4**, 196 – 202.

Balanč, B. D., Ota, A., Djordjević, V. B., Šentjerc, M., Nedović, V. A., Bugarski, B. M., Ulrih, N. P. (2015) Resveratrol-loaded liposomes: Interaction of resveratrol with phospholipids. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **117**, 1615–1626.

Balanč, B., Trifković, K., Đorđević, V., Marković, S., Pjanović, R., Nedović, V., Bugarski, B. (2016) Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. *Food Hydrocolloid.* **61**, 832 – 842.

Baldin, J. C., Michelin, E. C., Polizer, Y. J., Rodrigues, I., de Godoy, S. H. S., Fregonesi, R. P., de Lima, C. G., Fernandes, A. M., Trindade, M. A. (2016) Microencapsulated jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. *Meat Sci.* **118**, 15 – 21.

Banik, S., Mukherjee, R., Ghosh P., Karmakar, S., Chatterje, S. (2018) Estimation of plant pigments concentration from tulsi (*Ocimum sanctum* L.): a six months study. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 2681 – 2684.

Barba, F. J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Poojary, M. M., Roohinejad, S., Lorenzo, J. M., Koubaa, M. (2017) Impact of conventional and non-conventional processing on prickly pear (*Opuntia spp.*) and their derived products: From preservation of beverages to valorization of by-products. *Trends Food Sci. Tech.* **67**, 260 – 270.

Barros, L., Falcao, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas- Boas, M. Ferreira, I. C. F. R. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus sp.* Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.* **111**, 61 – 66.

Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Bušić, A., Franekić, J., Komes, D. (2014) Phytochemical attributes of four conventionally extracted medicinal plants and cytotoxic evaluation of their extracts on human laryngeal carcinoma (HEp2) cells. *J. Med. Food* **17**, 206 – 217.

Betoret, E., Calabuig-Jimenez, L., Barrera, C., Rosa, M.D. (2016) Sustainable drying technologies for the development of functional foods and preservation of bioactive compounds. U: Sustainable drying technologies (Olvera, J. R., ured.), IntechOpen, London/UK, str. 37 – 57.

Bhushani, J. A., Kurrey, N. K., Anandharamakrishnan, C. (2017) Nanoencapsulation of green tea catechins by electrospraying technique and its effect on controlled release and in-vitro permeability. *J. Food Eng.* **199**, 82 – 92.

Bigliardi, B., Galati, F. (2013) Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci. Tech.* **31**, 118 – 129.

Bonilla-Lagos, J., Vargas, F. C., de Oliveira, T. G., da Aparecida Makishi, G. L. do Amaral Sobral, P. J. (2015) Recent patents on the application of bioactive compounds in food: A short review. *Curr. Opin. Food Sci.* **5**, 1 – 7.

Boo, H.-O., Hwang, S., J., Bae, C., S., Park, S. H., Heo, B., G., Gorinstein, S. (2012) Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Ind. Crop. Prod.* **40**, 129 – 135.

Bozzuto, G., Molinari, A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomed.* **10**, 975 – 999.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol.* **28**, 25 – 30.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., Velić, D. (2011) Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus Carica* L.). *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **61**, 195 – 199.

Bursać-Kovačević, D., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., Montesano, D., Lorenzo, J. M., Putnik, P. (2018) Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chem.* **268**, 513–521.

Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Kovač, V., Špoljarić, I., Mršić, G., Komes, D. (2018) Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Res. Int.* **111**, 244 – 255.

Cagnasso, M., Boero, V., Franchini, M.A. Chorover, J. (2017) ATR-FTIR studies of phospholipid vesicle interactions with α -FeOOH and α -Fe₂O₃ surfaces. *Colloid. Surface. B.* **76**, 456–467.

Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., Martínez-Ávila, G. C. G. (2017) Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chem.* **237**, 1139–1148.

Cieślak -Boczula, K., Maniewska, J., Gryniewicz, G., Szeja, W., Koll, A., Hendrich, A. B. (2012) Interaction of quercetin, genistein and its derivatives with lipid bilayers – an ATR IR-spectroscopic study. *Vib. Spec.* **62**, 64–69.

Cuomo, F., Cofelice, M., Venditti, F., Ceglie, A., Miguel, M., Lindman, B., Lopez, F. (2018) In-vitro digestion of curcumin loaded chitosan-coated liposomes. *Colloid. Surface. B.* **168**, 29–34.

Cutrim, C. S., Alvim, I. D., Cortez, M. A. S. (2019) Microencapsulation of green tea polyphenols by ionic gelation and spray chilling methods. *J. Food Sci. Tech.* **56**, 3561 – 3570.

Cvjetko-Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631 – 1639.

Čanadanović-Brunet, J. M., Djilas, S. M., Četković, G. S., Tumbas, V. T., Mandić, A. I., Čanadanović, V. M. (2006) Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts, *Int. J. Food Sci. Technol.* **41**, 667-673.

Čalić, S., Friganović, E., Maleš, V., Mustapić, A. (2011) Funkcionalna hrana i potrošači. *Praktični menadžment: stručni časopis za teoriju i praksu menadžmenta* **2**, 51 – 57.

Dag, D., Guner, S., Oztop, M. H. (2019) Physicochemical mechanisms of different biopolymer's (lysozyme, gum arabic, whey protein, chitosan) adsorption on green tea extract loaded liposomes. *Int. J. Biol. Macromol.* **138**, 473 – 482.

De Moura, S. C. S. R., Berling, C. L., Garcia, A. O., Queiroz, M. B., Alvim, I. D., Hubinger, M. D. (2018) Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. *Food Res. Int.* **121**, 542 – 552.

De Moura, S. C. S. R., Schettini, G. N., Garcia, A. O., Gallina, D. A., Alvim, I. D., Hubinger, M. D. (2019) Stability of hibiscus extract encapsulated by ionic gelation incorporated in yogurt. *Food Bioprocess Tech.* **12**, 1500 – 1515.

De Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., Ramos, Ó. L. (2017) Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Adv. Colloid. Interf.* **243**, 23–45.

Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., Maji, T. K. (2017) Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Adv. Colloid. Interfac.* **239**, 136–145.

Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2014) Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Eng. Rev.* **7**, 450 – 492.

Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., Kumar, S. (2017) Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arab. J. Chem.* **10**, 1193 – 1199.

Emami, S., Azadmard-Damirchi, S., Peighambaroust, S. H., Valizahed, H., Hesari, J. (2016) Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *J. Exp. Nanosci.* **11**, 737 – 759.

Fabris, S., Momo, F., Ravagnan G., Stevanato, R. (2008) Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophys. Chem.* **135**, 76 – 83.

Feng, S., Sun, Y., Wang, P., Sun, P., Ritzoulis, C., Shao, P. (2019) Co-encapsulation of resveratrol and epigallocatechin gallate in low methoxy pectin-coated liposomes with great stability in orange juice. *Int. J. Food Sci. Tech.* **55**, 1872 – 1880.

Frenzel, M., Krolak, E., Wagner, A. E., Steffen-Heins, A. (2015) Physicochemical properties of WPI coated liposomes serving as stable transporters in a real food matrix. *LWT - Food Sci. Technol.* **63**, 527–534.

Garavand, F., Rahaei, S., Vahedikia, N., Jafari, S. M. (2019) Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. *Trends Food Sci. Tech.* **89**, 26 – 44.

García-Toledo, J. A., Torrestiana-Sánchez, B., Martínez-Sánchez, C. E., Tejero-Andrade, J. M., García-Bórquez, A., Mendoza-García, P. G. (2018) Nanoencapsulation of a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* ITV26 by microfluidization. *Food Bioprocess Tech.* **12**, 88 – 97.

Gasa-Falcon, A., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Martin-Belloso O. (2020) Nanostructured lipid-based delivery systems as a strategy to increase functionality of bioactive compounds. *Foods* **9**, 325 – 346.

Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., Azizi, M. H. (2016) Nanoencapsulation approach to improve antimicrobial and antioxidant activity of thyme essential oil in beef burgers during refrigerated storage. *Food Bioprocess Tech.* **9**, 1187 – 1201.

Gibis, M., Ruedt, C., Weiss, J. (2016) In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Res. Int.* **88**, 105 – 113.

González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., Robert, P. (2019) Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **279**, 40 – 48.

Gültekin-Özgüven, M., Karadağ, A., Duman, Ş., Özkal, B., Özçelik, B. (2016) Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies. *Food Chem.* **201**, 205 – 212.

Hasan, M., Elkhoury, K., Kahn, C. J., Arab-Tehrany, E., Linder, M. (2019) Preparation, characterization, and release kinetics of chitosan-coated nanoliposomes encapsulating curcumin in simulated environments. *Molecules* **24**, 2023 – 2037.

HRN EN ISO 20483 (2014), Žitarice i mahunarke, Određivanje sadržaja dušika i proračun sadržaja sirovih proteina - Prema Kjeldahl metodi.

HRN EN ISO 2171 (2010), Žitarice, Određivanje ukupnog pepela spaljivanjem.

Huang Y., Sheng J., Yang F., Hu Q. (2007) Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *J. Food Eng.* **78**, 687 – 692.

Huang, H.W., Hsu, C. P., Yang, B. B., Wang, C. (2013) Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends Food Sci Tech.* **33**, 54 – 62.

Huang, M., Su, E., Zheng, F., Tan, C. (2017) Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin. *Food Funct.* **8**, 3198 – 3208.

Huang, M., Liang, C., Tan, C., Huang, S., Ying, R., Wang, Y., Wang, Z., Zhang, Y. (2019) Liposome co-encapsulation as a strategy for the delivery of curcumin and resveratrol. *Food Funct.* **10**, 6447 – 6458.

Immordino, M. L., Dosio, F., Cattel, L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomed.* **1**, 297–315.

Isacchi, B., Bergonzi, M., Iacopi, R., Ghelardini, C., Galeotti, N., Bilia, A. (2016) Liposomal formulation to increase stability and prolong antineuropathic activity of verbascoside. *Planta Med.* **83**, 412 – 419.

Isik, B. S., Altay, F., Capanoglu, E. (2018) The uniaxial and coaxial encapsulations of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) concentrate by electrospinning and their in vitro bioaccessibility. *Food Chem.* **265**, 260–273.

Islam Shishir, M. R., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. (2018) Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci. Tech.* **78**, 34 – 60.

Islam Shishir, M. R., Karim, N., Gowd, V., Zheng, X., Chen, W. (2019) Liposomal delivery of natural product: A promising approach in health research. *Trends Food Sci. Tech.* **85**, 177 – 200.

Jamaludin, R., Kim, D. S., Md Salleh, L., Lim, S. B. (2020) Optimization of high hydrostatic pressure extraction of bioactive compounds from noni fruits. *J. Food Meas. Charact.* doi: 10.1007/s11694-020-00526-w.

Jędrusek-Golińska, A., Górecka, D., Buchowski, M., Wieczorowska-Tobis, K., Gramza-Michałowska, A., Szymandera-Buszka, K. (2020) Recent progress in the use of functional foods for older adults: A narrative review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **19**, 1 – 23.

Jokić, S., Aladić, K., Šubarić, D. (2018) Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Annu. Croat. Acad. Eng.* **21**, 247 – 258.

Jordheim, M., Calcott, K., Gould, K. S., Davies, K. M., Schwinn, K. E., Andersen, Ø. M. (2016) High concentrations of aromatic acylated anthocyanins found in cauline hairs in *Plectranthus ciliatus*. *Phytochemistry*. **128**, 27 – 34.

Jovanović, A., Petrović, P., Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski, B. (2017a) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine*. **37**, 37 – 42.

Jovanović, A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Godevac, D. M., Bugarski, B. M. (2017b) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Sep. Purif. Technol.* **179**, 369 – 380.

Juan, R., Pastor, J., Millan, F., Alaiz, M., Vioque, J. (2004) Amino acids composition of *Teucrium nutlet* proteins and their systematic significance. *Ann. Bot - London* **94**, 615 – 621.

Jun X, Deji S, Ye L, Rui Z (2011) Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves. *Food Control* **22**, 1473 – 1476.

Juranović-Cindrić, I., Zeiner, M., Glamuzina, E., Stinger, G. (2013) Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. *Microchem. J.* **107**, 185 – 189.

Karimi, N., Ghanbarzadeh, B., Hajibonabi, F., Hojabri, Z., Ganbarov, K., Kafil, H. S., Hamishehkar, H., Yousefi, M., Mokarram, R. R., Kamounah, F. S., Yousefi, B., Moaddab, S. R. (2019) Turmeric extract loaded nanoliposome as a potential antioxidant and antimicrobial nanocarrier for food applications. *Food Biosci.* **29**, 110 – 117.

Kaska, A., Mammadov, R. (2019) Antioxidant properties, proximate analysis, phenolic compounds, anthelmintic and cytotoxic screening of *Teucrium sandrasicum*; An endemic plant for Turkey. *Ital. J. Food Sci.* **31**, 322 – 346.

- Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furuno, T., Yamasaki, Y. (2009) Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem.* **133**, 964 – 969.
- Kaur, N., Singh, D. P. (2017) Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. *Appetite*, **112**, 167–187.
- Khan, S. A., Aslam, R., Makroo, H. A. (2018) High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *J. Food Process Eng.* **42**, 1 – 15.
- Kheynoor, N., Hosseini, S. M. H., Yousefi, G.-H., Hashemi Gahrue, H., Mesbahi, G.-R. (2018) Encapsulation of vitamin C in a rebaudioside-sweetened model beverage using water in oil in water double emulsions. *LWT - Food Sci. Technol.* **96**, 419 – 425.
- Kopjar, M., Knežević, I., Piližota, V. (2013) Sadržaj polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost voćnih sokova. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **2**, 42 – 49.
- Kubrakova, I.V., Toropchenova, E.S. (2008) Microwave heating for enhancing efficiency of analytical operations (review). *Inorg. Mater.* **44**, 1509 – 1519.
- Kurozawa, L. E., Hubinger, M. D. (2017) Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Curr. Opin. Food Sci.*, **15**, 50 – 55.
- Lee, J.-S., Chung, D., Lee, H. G. (2008) Preparation and characterization of calcium pectinate gel beads entrapping catechin-loaded liposomes. *Int. J. Biol. Macromol.* **42**, 178 – 184.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M., Upton, R. (2009) Comparison of the phenolic component profiles of skullcap (*Scutellaria lateriflora*) and germander (*Teucrium canadense* and *T. chamaedrys*), a potentially hepatotoxic adulterant. *Phytochem. Analysis* **20**, 298–306.
- Lin, L., Zhu, Y., Thangaraj, B., Abdel-Samie, M. A. S., Cui, H. (2018) Improving the stability of thyme essential oil solid liposome by using β -cyclodextrin as a cryoprotectant. *Carbohydr. Polym.* **188**, 243 – 251.

Lorenzo, J. M., Pateiro, M., Domínguez, R., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., Shpigelman, A., Granato, D., Franco, D. (2018) Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Rev. Int.* **106**, 1095 – 1104.

Luo, M., Zhang, R., Liu, L., Chi, J., Huang, F., Dong, L., Ma, Q., Jia, X., Zhang, M. (2020) Preparation, stability and antioxidant capacity of nano liposomes loaded with procyanidins from lychee pericarp. *J. Food Eng.* 110065.

Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S., Souza-Soares, L. A. (2014) Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *Int. Food Res. J.* **21**, 2201 – 2206.

Machado, A. R., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A., Souza-Soares, L. A., Cerqueira, M. A. (2018) Liposomes loaded with phenolic extracts of *Spirulina* LEB-18: Physicochemical characterization and behavior under simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* **120**, 656 – 667.

Maestrelli, F., Zerrouk, N., Cirri, M., Mennini, N., Mura, P. (2008) Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl-cyclodextrin complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* **34**, 1 – 11.

Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., del V. Alonso, S., Chiaramoni, N. S. (2011) Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Res. Int.* **44**, 3039 – 3046.

Marsanasco, M., Piotrkowski, B., Calabro, V., del Valle Alonso, S., Chiaramoni, N. S. (2015) Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: thermal stability, rheological and organoleptic properties. *J. Food Sci. Tech.* **52**, 7828 – 7838.

Mateos, H., Valentini, A., Robles, E., Brooker, A., Cioffi, N., Palazzo, G., (2019) Measurement of the zeta-potential of solid surfaces through Laser Doppler Electrophoresis of colloid tracer in a dip-cell: survey of the effect of ionic strength, pH, tracer chemical nature and size. *Colloid. Surface. A* **576**, 82 – 90.

- Miron, T. L., Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E., Herrero, M. (2011) Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *J. Chromatogr. A* **1218**, 4918 – 4927.
- Mohaisen, M. J. M., Yildirim, R. M., Yilmaz, M. T., Durak, Z. M. (2019) Production of functional yogurt drink, apple and orange juice using nano-encapsulated *L. brevis* within sodium alginate-based biopolymers. *Sci. Adv. Mater.* **11**, 1788 – 1797.
- Morais, R. M. S. C., Morais, A. M. M. B., Dammak, I., Bonilla, J., Sobral, P. J. A., Laguerre, J.-C., Afonso, M. J., Ramalhosa, E. C. D. (2018) Functional dehydrated foods for health preservation. *J. Food Quality* **2018**, 1 – 29.
- Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review, *Anal. Chim. Acta* **703**, 8 – 18.
- Nastić, N., Švarc-Gajić, J., Delerue-Matos, C., Morais, S., Barroso, M. F., Moreira, M. M. (2018) Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *J. Supercrit. Fluid.* **138**, 200 – 206.
- Nogueira, E., Gomes, A. C., Preto, A., Cavaco-Paulo, A. (2015) Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloid. Surface. B* **136**, 514 – 526.
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., Fernández-López, J. A. (2009) Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *J. Food Eng.* **90**, 471 – 479.
- Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) *Methods for analysis of musts and wines*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Pu, C., Tang, W., Li, X., Li, M., Sun, Q. (2019) Stability enhancement efficiency of surface decoration on curcumin-loaded liposomes: Comparison of guar gum and its cationic counterpart. *Food Hydrocolloid.* **87**, 29 – 37.

- Quispe Candori, S., Foglio, M. A., Rosa, P. T. V., Meireles, M. A. A. (2008) Obtaining b-caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by super critical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluid.* **46**, 27 – 32.
- Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S., Lepojević, Ž., Milošević, S. (2012) Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technol. Biotech.* **50**, 167 – 176.
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., Everett, D. W. (2014) Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chem.* **156**, 176 – 183.
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., Everett, D. W. (2016) Effect of liposomal encapsulation on the recovery and antioxidant properties of green tea catechins incorporated into a hard low-fat cheese following in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Bioprod. Process.* **100**, 238 – 245.
- Ray, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. (2016) An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Biosci.* **13**, 76–83.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231–1237.
- Rehman, N., U., Al-Sahai, J., M., S., Hussain, H., Khan, A., L., Gilani, S., A., Abbas, G., Hussain, J., Sabahi, J., N., Al-Harrasi, A. (2016) Phytochemical and pharmacological investigation of *Teucrium muscatense*. *Int. J. Phytomedicine* **8**, 567 – 579.
- Rezaei, S., Rezaei, K., Haghighi, M., Labbafi, M. (2013) Solvent and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace. *Food Sci. Biotechnol.* **22**, 1269 – 1274.

Rezaei Erami, S., Amiri, Z. R., Jafari, S. M. (2019) Nanoliposomal encapsulation of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) fruit extract as a rich source of health-promoting bioactive compounds. *LWT - Food Sci. Technol.* **116**, 108581.

Robert, P., Zamorano, M., González, E., Silva-Weiss, A., Cofrades, S., Giménez, B. (2018) Double emulsions with olive leaves extract as fat replacers in meat systems with high oxidative stability. *Food Res. Int.* **120**, 904 – 912.

Rocchetti, G., Blasi, F., Montesano, D., Ghisoni, S., Marcotullio, M. C., Sabatini, S., Cossignani, L., Lucini, L. (2018) Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. *Food Res. Int.* **115**, 319 – 327.

Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S., Grosso, C. R. F. (2012) Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food Bioprod. Process.* **90**, 37 – 42.

Santacruz, S., Castro, M. (2018) Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* **93**, 570 – 572.

Santhanam, A. K., Lekshmi, M., Chouksey, M. K., Tripathi, G., Gudipati, V. (2014) Delivery of omega-3 fatty acids into cake through emulsification of fish oil-in-milk and encapsulation by spray drying with added polymers. *Dry. Technol.*, **33**, 83 – 91.

Schoubben, A., Blasi, P., Giovagnoli, S., Rossi, C., Ricci, M. (2010) Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chem. Eng. J.* **160**, 363 – 369.

Shah, M. R., Imran, M., Ullah, S. (2017) Liposomes. U: Lipidbased nanocarriers for drug delivery and diagnosis (Shah, M. R., Imran, M., Ullah, S., ured.) William Andrew Publishing, Oxford, str. 63 – 110.

Shahid, M., Yusuf, M., Mohammad, F. (2015) Plant phenolics: A review on modern extraction techniques. U: Recent progress in medicinal plants: Analytical and processing techniques, (Govil, J. N., Pathak, M., ured.), Studium Press LLC, SAD, str. 265 – 287.

Shouqin, Z., Jun, X., Changzheng, W. (2005) High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biot.* **80**, 50–54.

Sinico, C., Caddeo, C., Valenti, D., Fadda, A. M., Bilia, A. R., Vincieri, F. F. (2008) Liposomes as carriers for verbascoside: Stability and skin permeation studies. *J. Lipos. Res.* **18**, 83 – 90.

Silverio, G. B., Sakanaka, L. S., Alvim, I. D., Shirai, M. A., Grosso, C. R. F. (2018) Production and characterization of alginate microparticles obtained by ionic gelation and electrostatic adsorption of concentrated soy protein. *Ciência Rural* **48**, 1 – 12.

Simić, V. M., Rajković, K. M., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N. Č., Lazić, M. L., Karabegović, I. T. (2016) Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Sep. Purif. Technol.* **160**, 89 – 97.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152 – 179.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.

Smistad, G., Nyström, B., Zhu, K., Grønvold, M. K., Røv-Johnsen, A., Hiorth, M. (2017) Liposomes coated with hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose: Influence of hydrophobic chain length and degree of modification. *Colloid. Surface. B* **156**, 79 – 86.

Stanković, M. S., Curcic, M. G., Žižić, J. B., Topuzović, M. D., Solujić, S. R., Marković, S. D. (2011a) Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 4190 – 4205.

Stanković, M. S., Niciforović, N., Topuzović, M., Solujić, S. (2011b) Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium Montanum* L. var. *Montanum*, *F. Supinum* L. Reichenb. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **25**, 2222 – 2227.

Sundaresan, P. R., Slavoff, S. A., Grundel, E., White, K. D., Mazzola, E., Koblenz, D., Rader, J. I. (2006) Isolation and characterisation of selected germander diterpenoids from authenticated *Teucrium chamaedrys* and *T. canadense* by HPLC, HPLC-MS and NMR. *Phytochem. Analysis* **17**, 243 – 250.

Tan, N. D., Tuyen, V. T. X., Thuy, N. M., (2018) Bioactive compounds, pigment content and antioxidant activity of *Pouzolzia zeylanica* plant collected at different growth stages. *Can Tho University Journal of Science* **54**, 54 – 61.

Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., Weiss, J. (2005) Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Crit. Rev. Food Sci.* **45**, 587 – 605.

Tsai, W. C., Rizvi, S. S. H. (2017) Simultaneous microencapsulation of hydrophilic and lipophilic bioactives in liposomes produced by an ecofriendly supercritical fluid process. *Food Res. Int.* **99**, 256 – 262.

Tunçtürk, R., Tunçtürk, M., Eryiğit, T. (2019) Van florasında yayılış gösteren *Teucrium Cinsine* ait bazı türlerin kimyasal içerikleri. *Tarım ve Doğa Derg* **22**, 138 – 142.

Vuković N., Milošević T., Sukdolak S., Solujić S. (2007) Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Evid-Based. Compl. Alt.* **4**, 17 – 20.

Vujanović, M., Zengin, G., Đurović, S., Mašković, P., Cvetanović, A., Radojković, M. (2018) Biological activity of extracts of traditional wild medicinal plants from the Balkan Peninsula. *S. Afr. J. Bot.* **120**, 213 – 218.

Wang, J., Martínez-Hernández, A., de Lamo-Castellví, S., Romero, M.-P., Kaade, W., Ferrando, M., Güell, C. (2020) Low-energy membrane-based processes to concentrate and encapsulate polyphenols from carob pulp. *J. Food Eng.* **281**, 109996.

Wielgorskaya, T. (1995) Dictionary of generic names of seed plants. Columbia University Press, New York.

Xi, J., Shen, D., Li, Y., Zhang, R. (2011) Ultrahigh pressure extraction as a tool to improve the antioxidant activities of green tea extracts. *Food Res Int.* **44**, 2783 – 2787.

Yan, L., Xi, J. (2017) Micro-mechanism analysis of ultrahigh pressure extraction from green tea leaves by numerical simulation. *Sep. Purif. Technol.* **180**, 51 – 57.

Ye, Q., Georges, N., Selomulya, C. (2018) Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends Food Sci. Tech.* **78**, 167 – 179.

Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M. (2015) Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Eng. Rev.* **8**, 23 – 34.

Zanoni, F., Primiterra, M., Angeli, N., & Zoccatelli, G. (2020) Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: effects on stability and color properties. *Food Chem.* **307**, 125535.

Zeiner, M., Juranović Cindrić, I., Požgaj, M., Pirkl, R., Šilić, T., Stinger, G. (2015) Influence of soil composition on the major, minor and trace metal content of Velebit biomedical plants. *J. Pharmaceut. Biomed.* **106**, 153 – 158.

Zhang, Y., Zhang, Y., Taha, A. A., Ying, Y., Li, X., Chen, X., Ma, C. (2018) Subcritical water extraction of bioactive components from ginseng roots (*Panax ginseng* C.A. Mey). *Ind. Crop. Prod.* **117**, 118 – 127.

Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H. (2019) Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **95**, 183 – 195.

Zlatić, M. N., Stanković, S. M., Simić, S. Z. (2017) Secondary metabolites and metal content dynamics in *Teucrium montanum* L. and *Teucrium chamaedrys* L. from habitats with serpentine and calcareous substrate. *Environ. Monit. Assess.* **189**, 110 – 125.

Zlatić, N. M., Stanković, M. S. (2019) Effects of calcareous and serpentinite parent material on the mineral characteristics of soils and plant material of *Teucrium montanum* L. (*Lamiaceae*). *Environ. Monit. Assess.* **191**, 564 – 585.

Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernandez, L. A., Madariaga, J. M. (1999) Optimization and comparison of microwave assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta* **50**, 345 – 357.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Kristina Vugrinec

Ime i prezime studenta