

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2022.

Martina Štefančić

FORMULIRANJE
INKAPSULIRANIH SUSTAVA
POLIFENOLNOG EKSTRAKTA
DOBRIČICE (*Glechoma hederacea*
L.) PRIMJENOM LIPOSOMA I
IONSKOG GELIRANJA

Rad je izrađen u Laboratoriju za 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-2019-04-5879) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Hvala prof. dr. sc. Draženki Komes na ljubaznosti, susretljivosti i stvorenom ugodnom ozračju prilikom izrade ovog rada.

Hvala asistentici Danijeli Šeremet na trudu, razumijevanju i svim savjetima koji su olakšali izvođenje eksperimentalnog dijela rada.

Hvala obitelji na strpljenju i podršci tijekom studiranja i hvala svima onima koji su unosili smijeh u studijske dane.

Hvala sestri Ivi, što me ohrabivala, vjerovala u mene i bila uz mene na svakom koraku, kao i Bonu uz kojeg je svaki trenutak bio veseliji.

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: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

FORMULIRANJE INKAPSULIRANIH SUSTAVA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) PRIMJENOM LIPOSOMA I IONSKOG GELIRANJA

Martina Štefančić, univ. bacc. nutr.
0058203896

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je formulirati inkapsulirane sustave polifenolnih ekstrakata dobričice (*Glechoma hederacea* L.) primjenom metode inkapsuliranja u liposome i ionskog geliranja te karakterizacija inkapsuliranih sustava spektrofotometrijskom i HPLC metodologijom. Kao nosači za inkapsulaciju ekstrakta metodom ionskog geliranja korišteni su alginat i njegove kombinacije s proteinima riže, bundeve i kikirikija. U ekstraktu dobričice određeni su udjeli ukupnih polifenola ($1186,20 \text{ mg GAE L}^{-1}$) i ružmarinske kiseline ($46,04 \text{ mg L}^{-1}$) kao dominantnog polifenola. Hidrogel česticama i inkapsuliranim sustavima liposoma određene su fizikalno-kemijske karakteristike, inkapsulacijska učinkovitost i antioksidacijski kapacitet. Najveća inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola (84,06 %) i ružmarinske kiseline (78,16 %) te najpoželjnija fizikalno-kemijska svojstva određena su u sustavu alginata i proteina riže. Liposomalna inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola iznosila je 94,66 %, a ružmarinske kiseline 97,64 %. Liposomi s inkapsuliranim ekstraktom dobričice bili su homogeniji i manji od praznih liposoma, koji su prema vrijednostima zeta potencijala bili stabilniji.

Ključne riječi: ionsko geliranje, liposomi, biljni proteini, polifenoli, dobričica

Rad sadrži: 51 stranica, 7 slika, 7 tablica, 106 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Danijela Šeremet, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Draženka Komes (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Marković (član)
4. prof. dr. sc. Nada Vahčić (zamjenski član)

Datum obrane: 28. ožujka 2022.

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: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

FORMULATION OF ENCAPSULATION SYSTEMS OF GROUND IVY (*Glechoma hederacea* L.)
POLYPHENOLIC EXTRACT BY LIPOSOMES AND IONIC GELATION

Martina Štefančić, univ. bacc. nutr.
0058203896

Abstract:

Aim of this paper was to formulate encapsulation systems of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) polyphenolic extract by ionic gelation and liposomes. Ground ivy extract was examined and results showed high total polyphenol content (1186,20 mg GAE L⁻¹) and confirmed that the main polyphenol is rosmarinic acid (46,04 ± 0,15 mg L⁻¹). Pure alginate and its combinations with rice, pumpkin and peanut proteins were used as delivery systems for encapsulation of extract polyphenols. Obtained hydrogel beads and liposomes were tested for physical-chemical properties, encapsulation efficiency and antioxidant capacity. Hydrogel beads formed with alginate and rice proteins showed the highest encapsulation efficiency of total polyphenols (84,06 %) and of rosmarinic acid (78,16 %), and also, the most convenient physical-chemical properties. Liposomal encapsulation efficiency of total polyphenols was 94,66 % and of rosmarinic acid was 97,64 %. Loaded liposomes were more homogeneous and smaller in size compared to empty liposomes, which showed greater stability, according to the zeta potential values.

Keywords: *ionic gelation, liposomes, plant protein, polyphenols, ground ivy*

Thesis contains: 51 pages, 7 figures, 7 tables, 106 references, 00 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Draženka Komes, PhD

Technical support and assistance: *Danijela Šeremet, MSc*

Reviewers:

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

Thesis defended: March 28th, 2022

Sadržaj

1. UVOD1

2. TEORIJSKI DIO3

2.1. LJEKOVITE BILJKE3

2.2. DOBRIČICA4

2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI6

2.4. METODE INKAPSULACIJE8

2.5. INKAPSULACIJA IONSKIM GELIRANJEM10

2.5.1. Alginat11

2.5.2. Biljni proteini12

2.6. INKAPSULACIJA LIPOSOMIMA14

3. EKSPERIMENTALNI DIO17

3.1. MATERIJAL17

3.1.1. Uzorci17

3.1.2. Kemikalije17

3.1.2.1. Bioaktivna karakterizacija ekstrakta dobričice17

3.1.2.2. Inkapsulacija ionskim geliranjem17

3.1.2.3. Liposomalna inkapsulacija18

3.1.3. Aparatura i pribor18

3.2. METODE19

3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta dobričice19

3.2.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakta dobričice19

3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola19

3.2.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom20

3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom21

3.2.2.4. Određivanje udjela ružmarinske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)22

3.2.3. Inkapsulacija ionskim geliranjem23

3.2.3.1. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti hidrogel čestica24

3.2.3.2. Određivanje boje hidrogel čestica24

3.2.3.3. Određivanje veličine hidrogel čestica24

3.2.3.4. SEM analiza hidrogel čestica25

3.2.4. Liposomalna inkapsulacija25

3.2.4.1. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti polifenolnih spojeva u liposomima25

3.2.4.2. Određivanje veličine, indeksa polidisperzije i zeta potencijala u inkapsuliranom sustavu liposoma26

4. REZULTATI I RASPRAVA27

4.1. KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNOG SASTAVA EKSTRAKTA DOBRIČICE27

4.2. INKAPSULACIJSKA UČINKOVITOST HIDROGEL ČESTICA28

4.3. VELIČINA I BOJA HIDROGEL ČESTICA31

4.4. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE HIDROGEL ČESTICA 32

4.5. UČINKOVITOST LIPOSOMALNE INKAPSULACIJE34

4.6. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA35

5. ZAKLJUČCI36

6. LITERATURA37

1. UVOD

U novije vrijeme, u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji poraslo je zanimanje za istraživanje primjene i implementacije polifenola uslijed njihovih pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka. Brojne ljekovite biljke upravo zbog prisutnosti polifenola imaju dugogodišnju primjenu u narodnoj medicini u svrhu liječenja različitih upalnih stanja. Jedna od njih je i dobričica (*Glechoma hederacea* L.), biljka čiji nadzemni dijelovi sadrže brojne polifenolne spojeve (Wang i sur., 2017). Unatoč dugoj tradiciji korištenja na području Azije i Europe, svojstva dobričice i njeni učinci nisu dovoljno istraženi. Međutim, dosadašnja saznanja pružaju uvid u potencijal vrijedan daljnjih istraživanja. Budući da su polifenoli nestabilni i skloni degradaciji u probavnom sustavu, razvijaju se različite metode inkapsulacije polifenolnih biljnih ekstrakata koje omogućuju očuvanje strukture i bioaktivnih svojstava polifenola te, uz to, prikrivaju njihov pomalo nepoželjan okus (Fang i Bhandari, 2010). Inkapsulacija je tehnologija pakiranja krutih, tekućih ili plinovitih tvari u obložene kapsule koje kontrolirano otpuštaju svoj sadržaj u određenim uvjetima (Desai i Park, 2005). Time je omogućena zaštita sadržaja od okolišnih uvjeta i produljenje roka trajanja proizvoda s inkapsuliranom tvari (Shahidi i Han, 1993). Postoji veliki broj metoda inkapsulacije kao što su sušenje raspršivanjem, metoda uklanjanja otapala, ionsko geliranje, kompleksna koacervacija, granična polikondenzacija, inkapsulacija liposomima i dr. Ionsko geliranje temelji se na uspostavi ionskih interakcija između komponenti suprotnih naboja. Metoda je jednostavna i blaga, provodi se na sobnoj temperaturi uz mali utrošak energije te je relativno niske cijene. Kao nosač najčešće se koristi alginat, no, zbog poroznosti alginatnog gela otežano je zadržavanje aktivnih komponenti, stoga se često kombinira s drugim polimernim materijalima poput proteina (Silverio i sur., 2018). Liposomi su nanočestice čiju strukturu čini dvosloj fosfolipida. Pogodni su za inkapsulaciju, prijenos i otpuštanje hidrofobnih, hidrofilnih i amfifilnih tvari budući da sadrže i lipidnu i vodenu fazu. Prednost njihove primjene jest kontrola otpuštanja i dostavljanja sadržaja na ciljano mjesto (Schafer i sur., 1992).

Cilj ovoga rada je formulacija inkapsuliranih sustava s polifenolnim ekstraktom dobričice primjenom liposoma i ionskog geliranja. U svrhu karakterizacije bioaktivnog sastava ekstrakta dobričice odredit će se udio ukupnih polifenola i ružmarinske kiseline te antioksidacijski kapacitet. Hidrogel česticama formiranima unutar različitih sustava nosača, kao i liposomima s inkapsuliranim ekstraktom dobričice odredit će se inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola i ružmarinske kiseline, učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta te

fizikalne karakteristike (boja, veličina i morfologija). Sustavi s najboljim karakteristikama i svojstvima odabrat će se za moguću daljnju implementaciju u prehrambene proizvode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJEKOVITE BILJKE

Ljekovite biljke tradicionalno se koriste u narodnoj medicini zbog terapijskih učinaka i prevencije razvoja različitih bolesti (kardiovaskularne bolesti, rak, upalna stanja i dr.). Sama uporaba biljaka u svrhu liječenja započela je spontano budući da su ljudi tražeći hranu sakupljali biljke kojima su ublažavali različite zdravstvene tegobe te su s vremenom stjecali i praktična iskustva o njihovoj učinkovitosti. O poznavanju ljekovitih biljaka svjedoče i stari zapisi i spomenici, primjerice kineski zapisi iz 5000.-4000. god. pr. Kr., asirski i babilonski zapisi, Stari zavjet, egipatski papirusi te djela grčkog liječnika Hipokrata i rimskih pisaca Dioskorida, Plinija i Galena (Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje).

Ljekovite biljke ili dijelovi biljaka mogu se koristiti u različitim oblicima, kao svježi pripravci, čajevi, dekoti, praškasti pripravci ili kao ekstrakti (vodeni ili alkoholni ekstrakti, tinkture, eterična ulja, balzami). U farmaceutskoj industriji ljekovito bilje cijenjeno je zbog kemijskih spojeva, tj. aktivnih komponentenata, poput polifenola, glikozida, alkaloida, tanina i dr., koje se onda mogu koristiti u sintezi lijekova. Osim što se mogu koristiti u medicinske svrhe, ljekovite biljke bitna su sastavnica prehrane zbog vitamina i eteričnih ulja koja sadrže, kao i aroma i okusa kojima obogaćuju hranu. Korištene su i u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji zbog prisutnosti antioksidansa, antimikrobnih agensa te svojstava arome i sposobnosti bojenja nekih biljaka (Škrovánková i sur., 2012).

Među aktivnim komponentama posebno su važni antioksidansi jer smanjuju ili inhibiraju oksidaciju lipida i drugih molekula, štiteći tako stanice od oštećenja izazvanih oksidacijom (Škrovánková i sur., 2012). Vrsta i koncentracija antioksidansa može varirati ovisno o vrsti biljke, varijetetu, okolišnim uvjetima, klimatskim razlikama, sezonskim varijacijama, stupnju zrelosti, geografskom položaju, načinima uzgoja te ostalim čimbenicima, kao što su rukovanje biljkom nakon berbe i tijekom prerade (Yesil-Celiktas i sur., 2007).

Antioksidacijska svojstva biljaka koje imaju ljekovita svojstva predmet su mnogih istraživanja. Najčešće biljke korištene u medicinske svrhe pripadaju porodicama usnača (lat. *Lamiaceae*) (ružmarin, origano, menta, bosiljak, mažuran, timijan, kadulja), štitarki (lat. *Apiaceae*) (kumin, komorač, kim), đumbirovki (lat. *Zingiberaceae*) (kurkuma, đumbir), ginka (lat. *Ginkgoaceae*) (ginko), glavočika (lat. *Asteraceae*) (kamilica) i mirta (lat. *Myrtaceae*) (eukaliptus) (Škrovánková i sur., 2012).

2.2. DOBRIČICA

Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) (Slika 1) je zeljasta višegodišnja biljka koja pripada porodici usnača (lat. *Lamiaceae*). Latinsko ime roda *Glechoma* potječe od grčke riječi *glechon*, koja je bila naziv za mirisnu metvicu, dok *hederacea* znači bršljan, zbog čega je u drugim jezicima poznata kao zemljani bršljan. Prirodno raste na području Europe i Azije, ponajviše u Kini, a udomaćila se i na prostorima Sjeverne Amerike i Novog Zelanda. Za rast joj odgovaraju vlažna i plodna tla bogata dušikom. Raste u kolonijama na livadama, travnjacima i u listopadnim šumama (Anonymous 1, 2021).

Stabljika je duguljasta i četverbridna, polegnuta na tlo, te može narasti do pola metra dužine. Listovi su nasuprotni, bubrežastog oblika i nazubljenih zaobljenih rubova te tamnozeleno boje. Cvjetovi su skupljeni po 3-4 u pršljenovima. Vjenčić je ljubičaste boje. Cvatnja traje od travnja do kolovoza. Plod je kalavac koji se raspada na 4 smeđa oraščića, a jedna biljka u sezoni proizvede takvih 50-200 plodova. Biljka se razmnožava sjemenom i zakorjenjivanjem novih stabljika, pri čemu se stvaraju nove kolonije (Anonymous 1, 2021).



Slika 1. Dobričica (Anonymous 1, 2021)

Nadzemni dijelovi biljke dobričice u tradicionalnoj medicini, na području Azije i Europe, koristili su se kao lijek za razne probavne, respiratorne, koštane i upalne bolesti, upravo zbog bioaktivnih spojeva kojima obiluje.

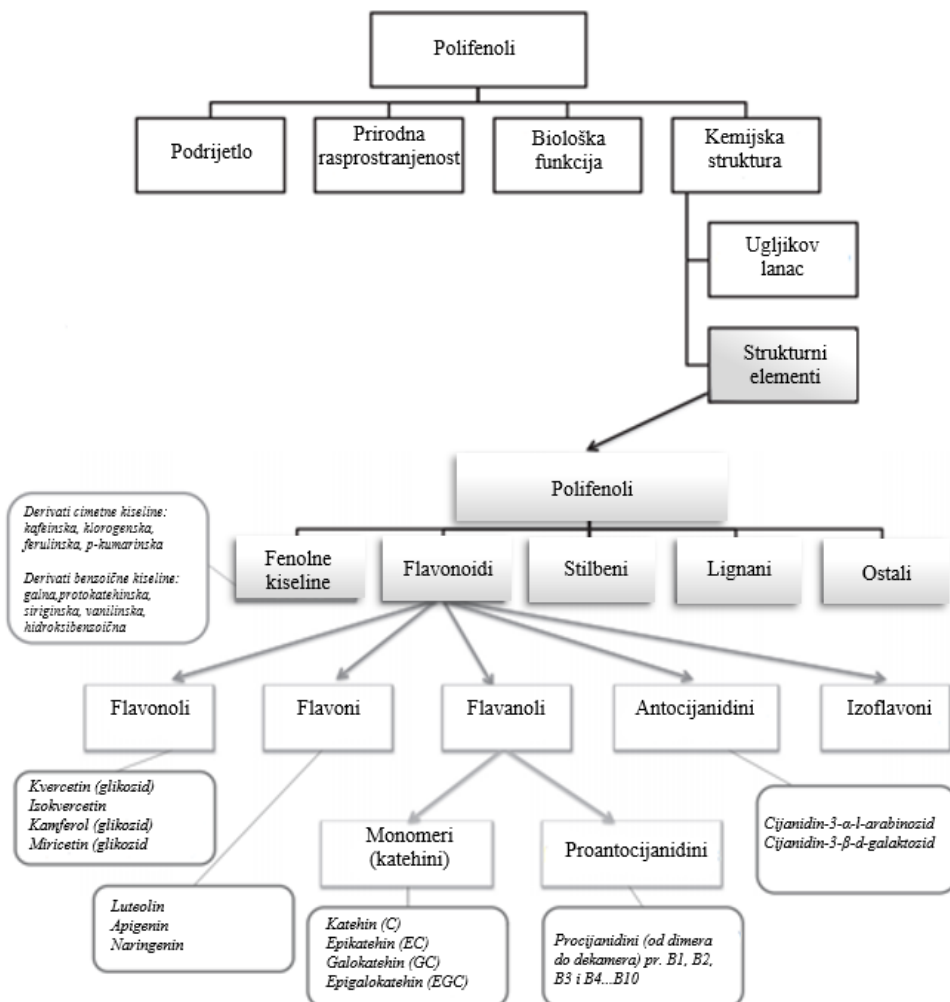
Biološki aktivne tvari su sekundarni biljni metaboliti koji biljkama pružaju zaštitu od parazita, patogena i UV zračenja, sudjeluju u fiziološkim procesima i daju biljkama boju (Liu, 2013). Do danas ih je identificirano i izolirano više od 5000 i dokazan je njihov pozitivan učinak

na zdravlje čovjeka. Bioaktivni spojevi koje dobričica sadrži uključuju polifenolne spojeve poput klorogenske, kafeinske, ferulinske i ružmarinske kiseline, rutina, genistina, genisteina i kvercetina (Wang i sur., 2017) te triterpenoide kao što su ursolična kiselina i oleanolična kiselina (Kim i sur., 2011). Među najzastupljenijim fenolnim spojevima su ružmarinska kiselina, karakteristična za biljne vrste porodice *Lamiaceae*, i klorogenska kiselina (Doring i Petersen, 2014). U sastavu dobričice identificirana su i dva alkaloida, hederacin A i hederacin B, koji citotoksično djeluju na stanice raka debeloga crijeva (Kumasamary i sur., 2006). Listovi sadrže polinezasićene masne kiseline, askorbinsku kiselinu, tokoferole (Kuhn i sur., 1989) i vrstu insekticidnog lektina naziva Gleheda (Singh i sur., 2006). U sastavu eteričnog ulja dobričice identificirani su brojni spojevi među kojima su najzastupljeniji seskviterpeni i monoterpeni, poput germacrena D i B, γ - i β -elemena, 1,8-cineola, (Z)- β -ocimena, koji se zbog svojih svojstava koriste u sintezi lijekova protiv raka (Mockute i sur., 2007).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na nekoliko farmakoloških učinaka dobričice. Vodeni ekstrakt dobričice pokazao je antibakterijsku, antikancerogenu, insekticidnu aktivnost te je djelovao stimulirajuće na trombocite (Singh i sur., 2006; Kumarasamy i sur., 2002). Također, dostupni rezultati istraživanja dokazuju protuupalna svojstva biljke. U *in vitro* istraživanju, u kojem su aktivirani makrofagi inkubirani dekoktom dobričice, značajno se smanjila produkcija dušikovog oksida i ekspresija upalnih citokina kao što su TNF- α i IL-12p70 (An i sur., 2006). *In vivo* istraživanjem na modelima štakora, s upalnim stanjem jetre, ekstrakt dobričice djelovao je na smanjenje upalnih procesa te upalnih markera poput NF- κ B, TNF- α , IL-1 β i IL-6 (Wang i sur., 2017). Zapažen je i učinak dobričice na razinu ekstracelularnog kalcija te antioksidacijsko djelovanje, što ju čini potencijalnim koanalgetikom (Hwang i sur., 2014; Milovanović i sur., 2010). Chao i suradnici (2021) ispitali su citotoksična svojstva polarne, etil acetatne, faze ekstrakta dobričice na HepG2 stanice hepatocelularnog karcinoma. Najzastupljenije polifenolne komponente polarne faze bile su ružmarinska, kafeinska i ferulinska kiselina. Primjena ekstrakta inducirala je zaustavljanje S-faze staničnog ciklusa i apoptozu HepG2 stanica te je zaključeno da se antitumorsko djelovanje ekstrakta dobričice odvija putem posredovanim mitohondrijima te indukcijom stresa i stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta. Uzimajući u obzir svojstva ekstrakta dobričice otvara se mogućnost njegovog razvoja kao sredstva u antitumorskoj terapiji. Citotoksični učinak ekstrakta dobričice ispitan je i na stanicama melanoma. Rezultati istraživanja nisu pokazali citotoksično djelovanje, već inhibiciju sinteze melanina u B16 stanicama melanoma, uslijed inhibicije ekspresije gena za tirozinazu. Prema tome, ekstrakt dobričice bi svojim depigmentacijskim djelovanjem mogao koristiti u rješavanju problema hiperpigmentacije (Qiao i sur., 2012).

2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi sekundarni su biljni metaboliti široko rasprostranjeni u carstvu biljaka te se nalaze u svakodnevnoj prehrani čovjeka. Naziv fenoli podrazumijeva skupinu od oko 8000 prirodno prisutnih spojeva kojima je zajednička strukturna karakteristika benzenskog prstena s vezanom barem jednom hidroksilnom skupinom. Klasificirani su u različite skupine (Slika 2) s obzirom na broj fenolnih prstena i strukturne elemente. S obzirom na strukturu razlikuju se fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Robbins, 2003). Jedan od glavnih razloga zbog kojeg su polifenolni spojevi predmetom brojnih istraživanja je antioksidacijsko djelovanje iz kojeg proizlazi njihova uloga u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom poput raka, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Scalbert i sur., 2005).



Slika 2. Klasifikacije biljnih polifenola i polifenolnih vrsta na temelju broja fenolnih prstenova i strukturnih elemenata (prema Bravo, 1998)

Ovisno o strukturnim karakteristikama, polifenoli ispoljavaju široki raspon različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Topljivi su u polarnim organskim otapalima, osim ako su esterificirani, eterificirani ili glikozilirani, te im u pravilu topljivost raste s porastom broja hidroksilnih skupina (Lattanzio i sur., 2008). Svi fenolni spojevi apsorbiraju zračenje UV spektra, dok obojeni apsorbiraju i zračenje vidljivog spektra, što ovisi o njihovoj strukturi i klasifikaciji. Primjerice, fenolne kiseline maksimum apsorpcije postižu na valnim duljinama 250-290 nm, a flavoni i flavonoli na valnim duljinama oko 250 nm i 350 nm (Lattanzio i sur., 2008). Kao sekundarni biljni metaboliti imaju ulogu, ne samo u zaštiti od patogena i UV zračenja, već i u signalizaciji između biljaka i drugih organizama (Lattanzio i sur., 2008) te u rastu i razvoju same biljke (Noel i sur., 2005). Boja biljaka (žuta, crvena, plava i ljubičasta) potječe upravo od polifenolnih spojeva. Osim toga, polifenolni spojevi, hlapljivi poput vanilina i eugenola, odgovorni su za miris biljaka. Karakteristični okusi gorčine i trpkosti biljaka također su povezani s prisutnošću polifenolnih spojeva (Cheynier, 2005).

Fenolne kiseline prisutne su u hrani biljnog podrijetla. U strukturi sadrže karboksilnu skupinu. Ovisno o ugljikovom kosturu, razlikuju se derivati hidroksicimetnih kiselina i hidroksibenzojevih kiselina. Također, broj i položaj hidroksilnih skupina utječu na svojstva fenolnih kiselina. U biljkama su većinom vezane za strukturne komponente biljke (celulozu, proteine i lignin) ili male organske molekule, dok je tek mali dio prisutan u obliku slobodnih kiselina. Zbog antioksidacijskog djelovanja prepoznate su kao važna komponenta hrane bitne u prevenciji oksidacijskog stresa i bolesti (Robbins, 2003).

Flavonoidi pripadaju skupini prirodnih spojeva te se razlikuju prema fenolnoj strukturi. Do sada je identificirano više od 4000 različitih vrsta flavonoida. Prisutni su u voću, povrću, žitaricama, korijenu, stabljici, kori i cvijetu biljke, čaju i vinu. Epidemiološka istraživanja navode kako unos flavonoida iz hrane smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih oboljenja. *In vitro* istraživanja ukazuju na njihovo protuupalno, antialergeno, antikancerogeno i antiviralno djelovanje. S obzirom na strukturu razlikuju se četiri skupine flavonoida: flavoni, flavanoni, katehini i antocijani (Nijveldt i sur., 2001).

Stilbeni su fenolni spojevi prisutni u mnogim različitim biljkama, poput vinove loze, kikirikija i bobičastog voća. Unutar skupine stilbena postoje velike razlike u strukturi, koja je bitan čimbenik u određivanju stope apsorpcije i metabolizma, te su prisutni brojni supstituenti poput glikozinih, hidroksilnih, metilnih i izopropilnih skupina. Jedan od najistraživanijih pripadnika ove skupine je rezveratrol, spoj koji pokazuje antioksidacijsko, antiproliferacijsko i protuupalno djelovanje (El Khawand i sur., 2018).

Lignani su sekundarni biljni metaboliti s velikom strukturnom raznolikošću. U malim udjelima prisutni su u žitaricama, voću i povrću, dok se u većim udjelima mogu naći u sezamu i lanenim sjemenkama. Postoje epidemiološka istraživanja koja ukazuju na važnu ulogu lignana u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti, no, učinci na ostale kronične bolesti zasad nisu poznati (Rodriguez-Garcia i sur., 2019).

2.4. METODE INKAPSULACIJE

Postoji veliki broj metoda inkapsulacije te se inkapsulirani proizvodi koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, ali i mnogim drugim područjima kao što su poljoprivreda, veterina, kemijska industrija, biotehnologija i biomedicina (Benita, 2006).

Ovisno o metodi inkapsulacije, dobivaju se čestice različite veličine, no, najčešće su to mikročestice ili nanočestice. Mikročestice mogu sadržavati krutu, tekuću ili plinovitu aktivnu komponentu, a veličine su od 1 μm do 1 mm. Nanočestice su veličine od 1 nm do 1 μm te se isto tako mogu razlikovati prema unutrašnjoj strukturi. Materijali kojima se čestice oblažu mogu biti polimeri, prirodnog ili sintetskog podrijetla, ili lipidi. Neki od razloga primjene inkapsulacije su zaštita osjetljive ili nestabilne komponente od okolišnih uvjeta, zaštita korisnika od nuspojava inkapsulirane komponente, modifikacija gustoće tekućine, promjena tekućine u krutinu te kontrola otpuštanja inkapsulirane aktivne komponente u probavnom sustavu. Polifenoli se obično inkapsuliraju u mikročestice kako bi se održala struktura spoja do njegove konzumacije ili administracije, kako bi se maskirao okus, povećala topljivost u vodenom mediju i bioraspodjeljivost te kako bi se polifenolni spoj očuvao i prenio do ciljanog mjesta (Munini i Edwards-Levy, 2011).

Metode inkapsulacije mogu se klasificirati kao: fizikalne, fizikalno-kemijske i kemijske.

- Fizikalne metode:
 1. Sušenje raspršivanjem podrazumijeva formiranje čestica disperzijom aktivne komponente u otopini nosača za oblaganje. Formirane mikročestice su veličine od 10 μm do 100 μm . Najčešće korišteni materijali za nosače su guma arabika, maltodekstrin i modificirani škrob te njihove kombinacije. Ova metoda rezultira formiranjem visokokvalitetnih i stabilnih čestica te je često korištena u prehrambenoj industriji (Giunchedi i Conte, 1995).
 2. Inkapsulacija primjenom superkritičnih fluida jedna je od novijih metoda. Svojstva superkritičnih fluida lako se mogu mijenjati promjenom tlaka i temperature. Najčešće korišteni superkritični fluid je ugljikov dioksid zbog svoje relativno niske kritične

temperature i tlaka, što ga čini pogodnim za procesiranje materijala osjetljivih na temperaturu. Također, superkritični ugljikov dioksid nije toksičan, niske je cijene te ima GRAS status (Cocero i sur., 2009).

- Fizikalno-kemijske metode:

1. Inkapsulacija hlađenjem emulzija je proces kojim se aktivna komponenta otapa ili dispergira u rastaljenom materijalu (Vandamme i sur., 2007). Rastaljena faza emulgira se u kontinuiranoj fazi zagrijanoj na temperaturi višoj od temperature taljenja materijala za oblaganje nakon čega se okoliš ubrzo rashladi te čestice prelaze u kruto stanje. Obično se kao materijal za oblaganje koriste lipidi niske točke taljenja, kao što je karnauba vosak. Ovim procesom moguća je mikroinkapsulacija i hidrofилnih i lipofilnih molekula, ako za odabranu kontinuiranu fazu nemaju dovoljno veliki afinitet.
2. Metoda uklanjanja otapala (engl. emulsification-Solvent Removal Methods) temelji se na hlapljenju ili ekstrakciji unutrašnje faze emulzije, pri čemu se polimer za oblaganje prvo otapa, a zatim taloži u obliku čestica. Polimer se otapa u organskom otapalu, koje nakon toga hlapi. U metodi hlapljenja otapala hlapljivo otapalo mora se slabo miješati s vodom, pa se odabire otapalo poput diklormetana. Aktivna komponenta se otapa ili dispergira u otopini polimera. Smjesa se emulgira homogenizatorom u vodi koja sadrži surfaktante koji održavaju stabilnost emulzije ulje u vodi. U metodi ekstrakcije otapala, otapalo se mora miješati s vodom u svim omjerima. Otopina polimera i aktivne komponente injektira se u kontinuiranu vodenu fazu koja sadrži surfaktant. Nanočestice formiraju se spontano difuzijom otapala u vodenu fazu. Polimer, koji je netopljiv u smjesi vode i otapala, taloži se formirajući nanočestice s aktivnom komponentom (Munini i Edwards-Levy, 2011).
3. Ostale metode: ionsko geliranje, precipitacija kiselinom, kompleksna koacervacija

- Kemijske metode:

1. *In situ* polimerizacija podrazumijeva emulgiranje monomerne komponente, poput stirena i metilmetakrilata, u vodenoj fazi koja sadrži odgovarajući surfaktant. Polimerizacija rezultira nastankom polimera netopivog u vodi koji tvori mikrosferu (Vandamme i sur., 2007).
2. Granična polikondenzacija je kemijska reakcija u kojoj se oko kapljica emulzije formira polimerna membrana. Reakcija se odvija na granici kontinuirane i disperzne faze. Svaka faza sadrži određeni tip monomera. Kada se monomer topiv u vodi zamijeni s oligomerom ili polimerom, dolazi do reakcije umrežavanja. U ovom slučaju reakcija kondenzacije

uključuje reaktivne skupine monomera netopivog u vodi te funkcionalne skupine oligomera ili polimera topivog u vodi (Munini i Edwards-Levy, 2011).

2.5. INKAPSULACIJA IONSKIM GELIRANJEM

Ionsko geliranje metoda je mikroinkapsulacije koja se temelji na sposobnosti unakrsnog povezivanja iona u prisutnosti polivalentnih iona poput Ca^{2+} , Ba^{2+} i Al^{3+} , pri čemu nastaju hidrogel čestice sferičnog oblika (Yao i sur., 2001). Provodi se ekstruzijom ili emulgiranjem/geliranjem. Najčešći način tvorbe hidrogel čestica je ekstruzija koja podrazumijeva ukapavanje vodene otopine polimera kroz iglu šprice u gelirajući medij koji sadrži kalcijev klorid. Emulgiranje/geliranje uključuje tvorbu emulzije aktivne hidrofobne komponente i vodene otopine polimera koja se onda ukapava u otopinu kalcijevih iona (Paques i sur., 2014). Inkapsulacija geliranjem može biti eksterna ili interna. Eksternim geliranjem kalcijevi ioni difundiraju iz vanjskog izvora u otopinu polimera (Davarcı i sur., 2017), dok se kod internog geliranja vodena otopina kalcijeve soli ukapava u otopinu polimera, što rezultira tvorbom kapsula kalcijeva alginata s vodom u sredini (Funami i sur., 2009).

Materijali koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju aktivnih komponenti u prehrambenoj industriji moraju imati GRAS status (Patel i sur., 2011). Kao nosači u ionskom geliranju često se koriste alginat, kitozan, pektin, gelan guma i karboksimetil celuloza. Od navedenih najčešće se koristi alginat jer je biorazgradiv, biokompatibilan i boljih gelirajućih svojstava od ostalih (Leong i sur., 2016).

U istraživanju koje su proveli Lupo i suradnici (2015) pokazalo se kako hidrogel čestice pripremljene internim ionskim geliranjem, u odnosu na one pripremljene eksternim, otpuštaju polifenole ekstrakta kakaa s odgodom upravo zbog razlike u strukturi hidrogel čestica koje su homogenije i kompaktnije. Može se reći kako su emulgiranje i interno ionsko geliranje bolji izbor, u odnosu na ekstruziju i eksterno, zbog veće inkapsulacijske učinkovitosti. Također, kombinacija alginata i proteina sirutke, kao nosača, bolje zadržava polifenole zbog slabije difuzije polifenola kroz matriks kalcijevog alginata i interakcija koje se uspostavljaju unutar strukture hidrogel čestice između proteina i polisaharida te proteina i polifenola. Belščak-Cvitanović i suradnici (2016) potvrdili su ovo saznanje u istraživanju provedenom s hidrofilnim polifenolima ekstrakta maslačka i lipofilnim β -karotenom koje su inkapsulirali emulgiranjem i internim ionskim geliranjem u hidrogel čestice bazirane na alginatu, pektinu i kombinacijama nosača s proteinima sirutke, gdje su najveću učinkovitost inkapsulacije imale upravo čestice s

kombinacijom nosača alginata i proteina sirutke. Primjeri implementacije inkapsulata u prehrambene proizvode prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz bioaktivnih tvari inkapsuliranih ionskim geliranjem i proizvoda u koje su iste implementirane

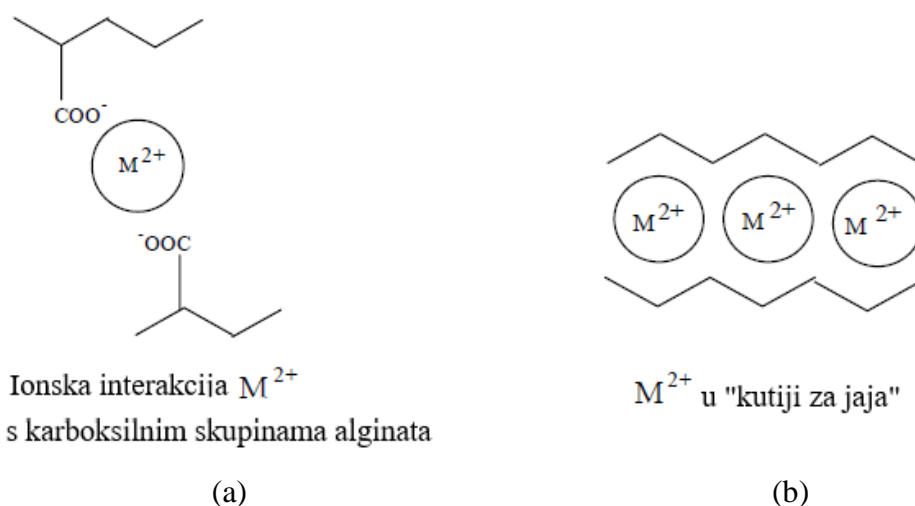
Inkapsulirana bioaktivna tvar	Proizvod u koji je implementirana bioaktivna tvar	Referenca
Ekstakt hibiskusa (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Žele bomboni	De Moura i sur., 2018
Ekstakt hibiskusa (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Jogurt	De Moura i sur., 2018
Probiotička bakterija <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Svježi sir	Santacruz i Castro, 2018
Ekstrakt ružmarina (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Ječmeni čaj	Lee i sur., 2018
Ulje chia sjemenki (<i>Salvia hispanica</i> L.)	Goveđi burger	Heck i sur., 2017
<i>Bifidobacterium longum</i>	Sok od ananasa	Phoem i sur., 2015
Ulje sjemenki lana (<i>Linum usitatissimum</i> L.) i ulje češnjaka (<i>Allium sativum</i> L.)	Kruh	Kairam i sur., 2021
Probiotičke bakterije <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> i <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Cheddar sir	Amine i sur., 2014

2.5.1. Alginat

Alginat je prirodni anionski polimer koji se komercijalno dobiva ekstrakcijom iz smeđih algi. Često se upotrebljava u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji zbog svojih poželjnih svojstava poput biokompatibilnosti, biorazgradivosti, niske toksičnosti, relativno niske cijene i svojstva geliranja u prisutnosti dvovalentnih kationa (Ca^{2+}) te se ne nakuplja u organizmu. Alginati se odnose na alginsku kiselinu i njezine derivate (Racovita i sur., 2009).

U svojoj strukturi sadrže dvije uronske kiseline, α -L-guluronsku i β -D-manuronsku kiselinu, povezane α -1,4-glikozidnom vezom. Alginatni hidrogelovi formiraju se metodom

ionskog geliranja uz dodatak metalnih iona. Pri tome guluronske jedinice alginata ulaze u interakciju s metalnim ionima te se guluronske jedinice jednog polimera povezuju s jedinicama drugog tvoreći specifičnu strukturu, tzv. „kutije za jaja“ (eng. „egg-box“) (Slika 3). Takvim povezivanjem jedinice su stabilne prema disocijaciji i formirane hidrogel čestice su sferičnog oblika (Racovita i sur., 2009). Povećanjem udjela guluronske kiseline gelovi su čvršći, dok su povećanjem udjela manuronske kiseline elastičniji (Lee i Mooney, 2012). Budući da je struktura mreže alginatnog gela porozna, inkapsulirana tvar brže difundira i izlazi iz mreže. Kako bi se spriječili gubici i povećala inkapsulacijska učinkovitost, alginat se oblaže drugim materijalima, poput polisaharida ili proteina (Silverio i sur., 2018).



Slika 3. Prikaz interakcija i povezivanja karboksilnih skupina (a) i metalnih iona (M^{2+}) (b) u alginatu (prema Racovita i sur., 2009)

2.5.2. Biljni proteini

Jedna od vrlo značajnih i obećavajućih uloga proteina je i u tehnologiji mikroinkapsulacije različitih tvari u područjima farmaceutske, prehrambene i kozmetičke industrije, pri čemu se proteini se koriste za formiranje nosača za inkapsulaciju bioaktivnih tvari. Zbog specifičnih fizikalno-kemijskih karakteristika proteini mogu djelovati kao sredstva za stvaranje emulzija, pjena i gelova, a zahvaljujući svojoj strukturi dobar su izbor nosača za bioaktivne tvari hidrofилne i hidrofobne prirode. Zanimanje za proteine biljnog podrijetla sve je veće jer predstavljaju alternativu za proteine životinjskog podrijetla i polimerne naftne derivate. Najčešće upotrebljavani proteini životinjskog podrijetla su želatina, proteini sirutke i kazein te

se kao nosači mogu koristiti sami ili u kombinaciji s polisaharidima, najčešće za inkapsulaciju tvari metodama koacervacije i sušenja raspršivanjem (Quintero i sur., 2017).

Uporaba proteina biljnog podrijetla u inkapsulaciji prati „zeleni“ trend koji u današnje vrijeme sve više promiču farmaceutska, prehrambena i kozmetička industrija. Također, u prilog njihovu korištenju ide i manja alergnost u odnosu na proteine životinjskoga podrijetla (Jenkins i sur., 2007; Li i sur., 2012). Od biljnih proteina koji se koriste kao nosači u mikroinkapsulaciji do sada su najistraživaniji izolat proteina soje, izolat proteina graška, proteini žitarica (zobi, pšenice, kukuruza i ječma), a istražuje se i potencijal proteina suncokreta, zobi i riže (Nesterenko i sur., 2013).

Proteini riže u sastavu sadrže oko 75 % glutenina, 15 % globulina, 6 % albumina i 3 % prolamina (Agoboola i sur., 2005). Karakteriziraju ih odlično održavanje stabilnosti pjene, visoki kapacitet emulzifikacije u otopinama šećera i dobra stabilizacija emulzija. Proteini riže mogu se povezivati s polisaharidima tvoreći precipitate, koji imaju potencijal za industrijsku primjenu (Fabian i sur., 2010). Fizikalno-kemijska svojstva slična su svojstvima kazeina (Chandi i sur., 2007) te proteinima riže daju svojstva poželjna za nosače u inkapsulaciji.

Proteini kikirikija dobivaju se djelomičnim uklanjanjem lipida iz kikirikija te dolaze u dva oblika ovisno o odabranim metodama pripreme- izolat i koncentrat. Većinu sastava proteina čine globulini, dok su albumini manje zastupljeni. Istraživanja funkcionalnih svojstava proteina kikirikija limitirana su te se uglavnom odnose na brašno kikirikija. Karakterizira ih slaba topljivost u vodi (NSI < 65 %) koja je nepoželjna prilikom implementacije u prehrambene proizvode. Metodama modifikacije strukture proteina moguće je utjecati na poboljšanje svojstava topljivosti, emulzifikacije, pjenjenja te vezanja lipida (Ma i sur., 2017). Jedan od glavnih čimbenika koji utječe na odabir proteina kikirikija kao nosaša jest njihov alergeni potencijal (Quintero i sur., 2017).

Proteini čine 24-36,5 % sastava sjemenki bundeve. Pokazuju slabiju topljivost u vodi, slabiju sposobnost tvorbe pjene te dobru sposobnost stabilizacije emulzije uslijed niske ionske jakosti. Proteinski ekstrakti sjemenki bundeve zahtijevaju modifikacije radi unaprjeđenja njihovih funkcionalnih svojstava i potencijalne primjene u prehrambenim proizvodima (Rezi i sur., 2015).

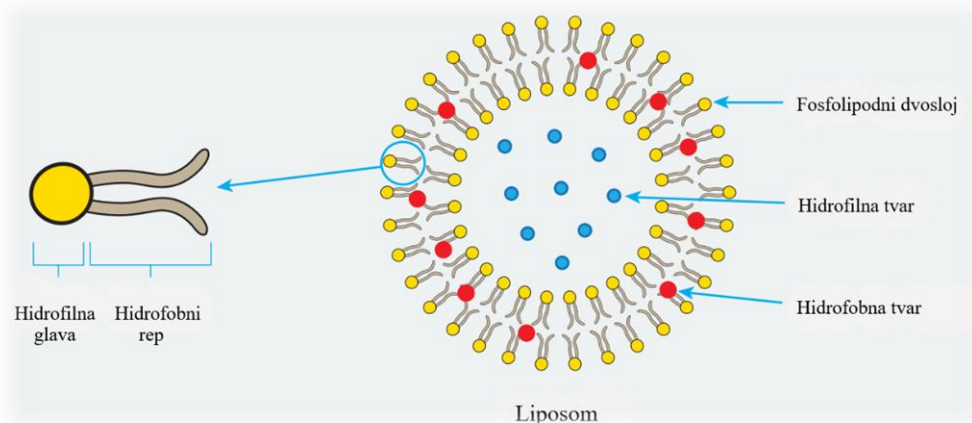
Svojstva poput topljivosti, sposobnosti tvorbe emulzija i pjenjenja, dobro povezivanje s polisaharidima, otvaraju mogućnost za nova područja primjene biljnih proteina i razvoj sustava nosača te funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Međutim, visoka cijena ekstrakcije i slabija topljivost nekih proteina mogu ograničiti njihovu primjenu. U odnosu na ostale prirodne materijale, poput polisaharida i životinjskih proteina, proteini biljnoga podrijetla također imaju

značajan potencijal primjene kao nosači u mikroinkapsuliranim sustavima (Nesterenko i sur., 2013).

2.6. INKAPSULACIJA LIPOSOMIMA

Liposomi (Slika 4) su sferične lipidne čestice širokog područja primjene. Primarno se koriste u proizvodnji lijekova, no, od nedavno porastao je interes za njihovu primjenu u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Ono što ih čini prikladnima za primjenu u prehrambenom sektoru jest mogućnost industrijske proizvodnje te način pripreme koji uključuje prirodne sastojke (biorazgrađive, kompatibilne i netoksične), što u konačnici omogućuje njihovu lakšu implementaciju u pogledu zadovoljenja zakonske regulative.

Formiranje liposoma temelji se interakcijama između amfifilnih molekula, najčešće fosfolipida, i molekula vode, gdje se uslijed uspostave interakcija između hidrofilnih glava i lipofilnih ugljikovodičnih repova lipida formira se lipidni dvosloj, dok interakcije dvosloja s molekulama vode omogućuju organizaciju lipida u sferične vezikule-liposome (Fathi i sur., 2012).



Slika 4. Shematski prikaz strukture liposoma i inkapsulacije tvari (prema Husseinu i sur., 2018)

Fosfolipidni dvosloj sastoji se od fosfatidilkolina, fosfatidilglicerola, dipalmitoilfosfatidilkolina, distearoilfosfatidilkolina, kolesterola, stearylamina, diacetilfosfata ili smjese. Svojstva dvosloja, poput čvrstoće, fluidnosti i naboja, ovisit će upravo o njegovu sastavu. Neki autori predlažu da zasićeni fosfolipidi, primjerice dipalmitoilfosfatidilkolin,

formiraju nepropusni i kruti dvosloj, dok nezasićeni, fosfatidilkolin iz jaja ili soje, formiraju propusnije i manje stabilne dvosloje (Akbarzadeh i sur., 2013). Veličina i struktura liposoma ovise o sastavu, metodi pripreme i okolišnim uvjetima (Reza Mozafari i sur., 2008).

U današnje vrijeme prisutne su mnoge metode pripreme liposoma. Od konvencionalnih metoda poznate su hidratacija tankih fosfolipidnih filmova vodenim otopinama, evaporacija reverzne faze, metoda injektiranja otapala i metoda zagrijavanjem. Glavni nedostaci ovih tehnika su velike čestice liposoma, uporaba organskih otapala i toksičnih materijala. Upravo zato razvijaju se nove metode kojima bi se premostili nedostaci konvencionalnih. Kako bi se producirali liposomi odgovarajuće veličine provode se ekstruzija, soniranje, homogenizacija visokim tlakom ili mikrofluidizacija kao koraci koji se provode nakon formiranja liposoma, a ujedno pridonose i povećanju inkapsulacijske učinkovitosti (Bozzuto i Molinari, 2015).

Liposome karakterizira visoka bioraspoloživost, biokompatibilnost, biorazgradivost te visoka propusnost kroz staničnu membranu, što proizlazi iz njihove strukture i sastava (Slingerland i sur., 2012). No, unatoč brojnim prednostima, primjena liposoma u prehrambenoj industriji ograničena je zbog velikih troškova i dugotrajnog procesa proizvodnje, kemijske i fizikalne nestabilnosti, lipidne oksidacije te širokog raspona veličine liposoma (Tan i Misran, 2013). Prema tome, prilikom primjene metode inkapsulacije liposomima treba uzeti u obzir navedene nedostatke.

Inkapsulacija liposomima koristi se za enzime, proteine, vitamine, arome, mineralne tvari, antioksidanse i antimikrobne tvari. Pokazalo se kako je inkapsulirana tvar u liposomima stabilizirana i zaštićena od okolišnih promjena (temperature, pH, vlage i ionske jakosti) koje mogu djelovati degradirajuće (Augustin i Hemar, 2009). Vrlo često liposomi se primjenjuju i za inkapsulaciju tvari nosioca nepoželjnih okusa, kao što su kinin i propranolol, kako bi se isti maskirali, budući da lipidi ne ulaze u interakcije s okusnim pupoljcima (Sun-Waterhouse i Wadhwa, 2013). Primjeri inkorporacije liposoma u prehrambene proizvode prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz bioaktivnih tvari inkapsuliranih liposomima i proizvoda u koje su iste implementirane

Inkapsulirana bioaktivna tvar	Proizvod u koji je implementirana bioaktivna tvar	Referenca
Katehin i epigalokatehingalat	Nemasni tvrdi sir	Rashidinejad i sur., 2014
Vitamin C i vitamin E	Sok od naranče	Marsanasco i sur., 2015
Ekstrakt crne murve (<i>Morus nigra</i> L.)	Tamna čokolada	Gültekin-Özgüven i sur., 2016
Ekstrakt trave ive (<i>Teucrium montanum</i> L.)	Kava	Šeremet i sur., 2021
Vitamin D3	Jogurt	Jafari i sur., 2019
Vitamin D3	Mlijeko	Kiani i sur., 2017
Omega-3	Kruh	Rasti i sur., 2017
Ulje škampa	Obrano mlijeko	Gulzar i sur., 2020

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Kao biljni materijal za ekstrakciju polifenolnih spojeva korištena je biljka dobričica (*Glechoma hederacea* L.) (Travar M.B., Bjelovar, Hrvatska). Nadzemni dijelovi biljke su osušeni na zraku (3 dana) na udjel suhe tvari >90 %, usitnjeni i prosijani kroz sito na željenu veličinu čestica (< 450 μm).

3.1.2. Kemikalije

3.1.2.1. Bioaktivna karakterizacija ekstrakta dobričice

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Acetonitril, Fischer Scientific (Waltham, SAD)

Etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)

Mravlja kiselina, Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)

Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Ružmarinska kiselina, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

3.1.2.2. Inkapsulacija ionskim geliranjem

Kalcijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev citrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Proteinski prah bundeve (masti 10,8 %, ugljikohidrati 17,3 %, proteini 51,4 %), Nutrigold (Zagreb, Hrvatska)

Proteinski prah kikirikija (masti 13,3 %, ugljikohidrati 26,6 %, proteini 53,3 %), Nutrigold (Zagreb, Hrvatska)

Proteinski prah riže (masti 4,5 %, ugljikohidrati 2,9 %, proteini 83,0 %), Nutrigold (Zagreb, Hrvatska)

Sol alginske kiseline, Sigma-Aldrich (St. Louis, Ujedinjeno Kraljevstvo)

3.1.2.3. Liposomalna inkapsulacija

Etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Kloroform, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)

Phospholipon® 90 NG, Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Njemačka)

3.1.3. Aparatura i pribor

Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)

Automatska mikropipeta volumena 100 -100 µL (Gilson, SAD)

Celulozno-acetatni mikrofilteri veličine pora 0,45 µm (CA-45/25), Machery-Nagel (Düren, Njemačka)

Centrifuga SL 8/8R, Thermo Scientific (Suzhou, Kina)

Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak 0,2 mm) (Naarden, Nizozemska)

HPLC kolona Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 µm, 100 Å), Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD)

HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD)

HPLC-DAD sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom), Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD)

Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje

Kolorimetar, Konica Minolta CM-700d (Tokio, Japan)

Laboratorijske čaše

Liofilizator Christ, Alpha 1-2 LD plus (Osteorode, Njemačka)

Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)

Rotavapor IKA RV8 (Staufen, Njemačka)

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM), TESCAN Mira 3 (Brno, Češka)

Spektrofotometar Helios γ, ThermoSpectronic (Cambridge, Velika Britanija)

Staklene epruvete

Staklene pipete

Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Uređaj za homogenizaciju reakcijske smjese – Vortex, Dlab Scientific (Schiltigheim, Francuska)

Vodena kupelj Inko VKZ ERN. Inkolab d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta dobričice

Ekstrakcija polifenolnih spojeva dobričice pripremljena je u vodenoj kupelji (100 °C, 10 min) sa omjerom uzorak:otapalo 1g/25 mL pri čemu je kao otapalo korištena destilirana voda. Nakon ekstrakcije slijedilo je centrifugiranje (9500 rpm, 15 min) te filtracija (filter papir Whatman br. 4). Tako pripremljeni ekstrakt podvrgnut je analizi bioaktivnog sastava i korišten za ionsko geliranje.

3.2.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakta dobričice

3.2.2.1. *Određivanje udjela ukupnih polifenola*

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola (UP) 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., 1999a; Singleton i sur., 1999b). 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 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20 %-tne otopine (w/v) natrijevog karbonata (Na₂CO₃) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija

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 µL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje [1]:

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad [1]$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg GAE L⁻¹)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg GAE L⁻¹), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provodi se u dvije paralelene probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama kao ekvivalenti galne kiseline (engl. *galic acid equivalents* – GAE).

3.2.2.2. *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 apsorbancije 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 (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata (persulfat) 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 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96 %-tnim) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1 %, tako da apsorbanacija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$ (1 mL otopine ABTS+ radikala se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom).

Volumen od 20 μL uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS+ radikala u epruveti te se izmjeri apsorbanacija na 734 nm nakon točno 6 min. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanaciju slijepe probe koja se priprema na isti način, samo umjesto uzorka sadrži isti volumen etanola. Oduzimanjem apsorbanacije uzorka od apsorbanacije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata prema jednadžbi baždarne krivulje [2]:

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [2]$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka ($\text{mmol Trolox-a L}^{-1}$)

y – izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provodi se u dvije paralelene probe ($n=2$), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama kao ekvivalenti Trolox-a.

3.2.2.3. *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. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - antioksidans koji gasi slobodne radikale, dolazi do

sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. Apsorbancija te otopine mora biti ~ 1. U tamnu epruvetu se otpipetira 100 µL uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 min po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 µL metanola. Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje [3] konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a L⁻¹):

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [3]$$

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L⁻¹)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 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 DPPH metodom provodi se u dvije paralelene probe (n=2), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

3.2.2.4. Određivanje udjela ružmarinske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Ekstrakt dobričice je profiltriran kroz celulozno-acetatni mikrofilter veličine pora 0,45 µm u HPLC vijalice. Analiza se provodila na HPLC sustavu Agilent 1200 Series s DAD detektorom (engl. *Diode Array Detector*). U sustav je injektirano 5 µL uzorka te su provedena dva paralelna mjerenja. Analiza je provedena kromatografijom obrnutih faza na koloni Zorbax Extend C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm i.d.) termostatiranoj na 25 °C pri čemu su kao mobilne faze korištene 1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (mobilna faza B) u različitim udjelima. Eluiranje analita provođeno je gradijentno pri protoku od 1 mL min⁻¹, tijekom 52 min, a ružmarinska kiselina je detektirana

pomoću DAD detektora pri valnoj duljini od 320 nm prema režimu elucije prikazanom u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz režima elucije analita za HPLC analizu ružmarinske kiseline

Vrijeme (min)	Volumni udio otapala		Protok (mL min ⁻¹)
	A (%)	B (%)	
0	93	7	1
5	93	7	1
45	60	40	1
47	30	70	1
52	30	70	1

Identifikacija ružmarinske kiseline provedena je usporedbom retencijskih vremena i UV spektra izdvojenog pika na kromatogramu sa odgovarajućim HPLC standardom. Kvantifikacija ružmarinske kiseline provedena je pomoću baždarnog pravca [4]:

$$y = 10,876x - 0,1215 \quad [4]$$

gdje su:

x – koncentracija ružmarinske kiseline ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

y – površina ispod pika na valnoj duljini od 320 nm (mAu s)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.3. Inkapsulacija ionskim geliranjem

Za inkapsulaciju polifenolnog ekstrakta dobričice pripravljena su 4 sustava nosača na bazi alginata u kombinaciji s proteinima: čisti alginat – AL; alginat i proteini bundeve – A_PB; alginat i proteini kikirikija – A_PK; te alginat i proteini riže – A_PR.

Otopine sustava nosača pripravljene su otapanjem samog alginata te alginata i biljnih proteina u vodenom ekstraktu dobričice, u odgovarajućem masenom omjeru, te su otapane na magnetnoj miješalici pri sobnoj temperaturi tijekom noći (oko 16 h). Za formiranje hidrogel čestica sa alginatom kao nosačem, pripravljena je 3 % (w/w) otopina alginata u ekstraktu, dok su u

slučaju pripreme otopina nosača s alginatom i biljnim proteinima, oni pomiješani u omjeru 1:4 te otopljeni u ekstraktu da se postigne konačni maseni omjer proteina u otopini od 12 % (w/w). Kao gelirajući medij korištene su 3 %-tna (w/w) i 12 %-tna (w/w) otopina kalcijevog klorida, koje su pripremljene otapanjem CaCl₂ u ekstraktu dobričice. 3 %-tna otopina CaCl₂ korištena je za sustav čistog alginata, dok je 12 %-tna otopina CaCl₂ korištena za sustave alginata u kombinaciji s proteinima. Hidrogel čestice formirane su postupkom ukapavanja. Pripremljena otopina nosača u ekstraktu dobričice prebačena je u plastičnu špricu te istiskivana kroz iglu (20 G) u prethodno pripremljene otopine gelirajućeg medija, koje su, tijekom postupka, miješane na magnetnoj miješalici. Pri tome su se formirale čestice sferičnog oblika. Čestice su miješane u otopini gelirajućeg medija još 10 min, nakon čega su izdvojene iz otopine, isprane destiliranom vodom i spremljene u ekstrakt na +4 °C. Kao kontrolne čestice, pripremljeni su sustavi nosača koji su umjesto ekstrakta dobričice sadržavali destiliranu vodu.

3.2.3.1. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti hidrogel čestica

Udio ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet i udio ružmarinske kiseline sadržane u hidrogel česticama pripremljenima s alginatom te kombinacijom alginata i proteina određeni su otapanjem poznate mase hidrogel čestica u 4 % (w/v) i 12 % (w/v) otopini natrijevog citrata na magnetnoj miješalici. Kako bi se ispitala inkapsulacijska učinkovitost polifenola koja potječe od ekstrakta dobričice, pripremljene su i analizirane kontrolne čestice koje su umjesto ekstrakta dobričice sadržavale destiliranu vodu. Inkapsulacijska učinkovitost (%) izražena je kao omjer udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta i udjela ružmarinske kiseline u otopini citrata s otopljenim mikročesticama te njihovog udjela u početnoj otopini.

3.2.3.2. Određivanje boje hidrogel čestica

Određivanje boje hidrogel čestica provedeno je pomoću prijenosnog spektrofotometra. Rezultati su izraženi kao CIE koordinate parametara L* (svjetlina), a* (crveno/zeleno obojenje) i b* (žuto/plavo obojenje). Ukupna promjena boje (ΔE) izračunata je pomoću parametara ΔL^* , Δa^* i Δb^* , pri čemu su kao kontrolne čestice korištene hidrogel čestice pripremljene s alginatom [5].

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad [5]$$

3.2.3.3. Određivanje veličine hidrogel čestica

Veličina hidrogel čestica određena je korištenjem Dino-Lite kalibracijske pločice (minimalan razmak = 0,2 mm) te su snimljene digitalnim fotoaparatom.

3.2.3.4. SEM analiza hidrogel čestica

Princip:

Metoda analize hidrogel čestica skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) koristi snop elektrona koji skenira uzorak i reagira s elektronima na površini koju skenira. Slika se formira pomoću detektora koji hvataju te elektrone. Analizira se morfologija polimera te je moguće vidjeti teksturu uzorka, veličinu, oblik, sastav i kristalnu strukturu uzorka. Uzorci moraju biti dovoljno mali kako bi stali u komoru, suhi te električki provodljivi. Zbog toga se obično prekrivaju slojem električki provodljivog materijala (Anonymous 2, 2021).

Postupak rada:

Pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa analizirane su morfološke karakteristike liofiliziranih hidrogel čestica inkapsuliranih polifenolima dobričice. Hidrogel čestice pričvršćene su na nosače pomoću dvostruko ljepljive trake i prekrivene tankim slojem električki vodljivog materijala - Au. Analiza je provedena korištenjem akcelerirajućeg napona 4-5 kV.

3.2.4. Liposomalna inkapsulacija

Za inkapsulaciju u liposome korišten je liofilizirani ekstrakt dobričice. U Erlenmayerovoj tikvici otopi se jednaka masa Phospholipona 90NG (P90NG) i etanola uz miješanje na magnetskoj miješalici. Važno je zatvoriti vrh tikvice aluminijskom folijom kako bi se spriječila evaporacija etanola. Da bi se pospješilo otapanje P90NG u etanolu, tikvica se stavi u vodenu kupelj (60 °C) na 1 min nakon čega se u smjesu se direktno dodaje prethodno pripremljena otopina liofiliziranog ekstrakta dobričice (50 mg u 2 mL destilirane vode). Smjesa se potom zagrijava u vodenoj kupelji (60 °C) 2 min, a zatim ohladi na sobnoj temperaturi u mraku. Pomoću peristaltičke pumpe u Erlenmayerovu tikvicu dodaje se destilirana voda. Protok vode podesi se na 15 mL h⁻¹. Tijekom miješanja važno je tikvicu obložiti aluminijskom folijom kako bi se spriječio negativan utjecaj svjetla na stabilnost bioaktivnih spojeva.

3.2.4.1. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti polifenolnih spojeva u liposomima

Nakon što se liposomi podvrgnu centrifugiranju (6000 rpm, 1 h), izdvoji se supernatant koji se analizira, dok se preostali ostaci liposoma isperu vodom, centrifugiraju (6000 rpm, 30 min), resuspendiraju u 1 mL destilirane vode i otope u smjesi kloroforma i metanola (1 mL:1 mL). Smjesa se vorteksira 1 min te se odvajanje faza dodatno ubrza kratkim centrifugiranjem. Gornja faza koja sadrži vodu i metanol sakuplja se i analizira. Kako bi se odredila inkapsulacijska učinkovitost, određivanje udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta i udjela ružmarinske kiseline provedeno je u sakupljenim supernatantima i vodeno-metanolnim fazama.

3.2.4.2. Određivanje veličine, indeksa polidisperzije i zeta potencijala u inkapsuliranom sustavu liposoma

Veličina, indeks polidisperzije i zeta potencijal liposoma određuje se na uređaju Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNOG SASTAVA EKSTRAKTA DOBRIČICE

Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakta dobričice uključivala je određivanje udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta te udjela ružmarinske kiseline. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakta dobričice

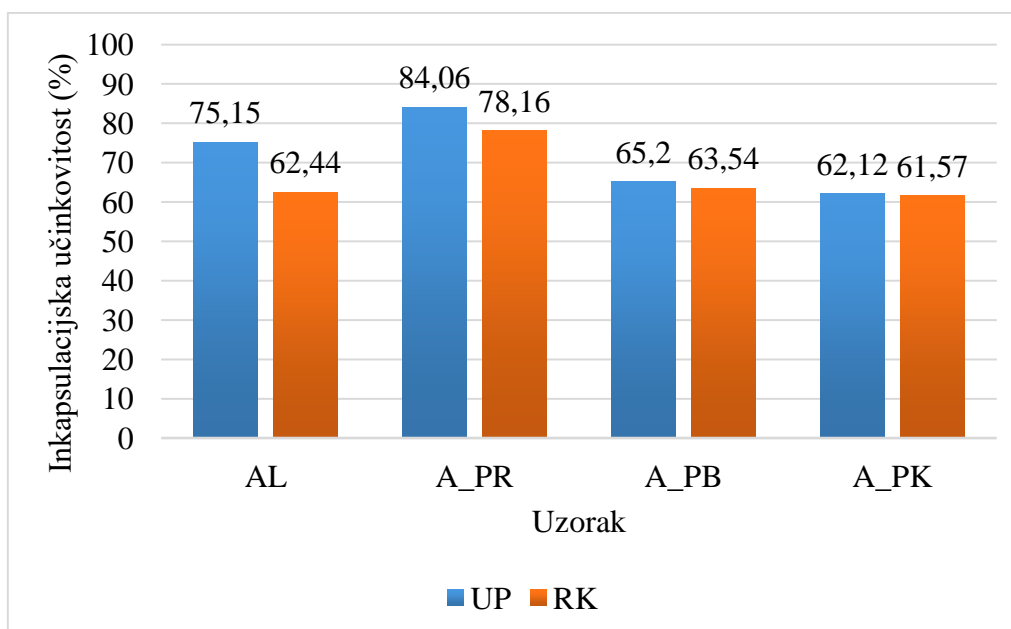
Udio ukupnih polifenola (mg GAE L ⁻¹)	Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox L ⁻¹)		Udio ružmarinske kiseline (mg L ⁻¹)
	DPPH	ABTS	
1186,20 ± 12,75	3,33 ± 0,01	4,05 ± 0,01	46,04 ± 0,15

Prema vrijednostima dobivenima određivanjem udjela ukupnih polifenola (1186,20 mg GAE L⁻¹) i antioksidacijskog kapaciteta (3,33 i 4,05 mmol Trolox L⁻¹), dobričica se pokazala kao biljka bogata polifenolnim spojevima, među kojima se ističe ružmarinska kiselina (46,05 mg L⁻¹). Budući da ABTS reagens reagira s hidrofilnim i hidrofobnim skupinama, a DPPH samo s hidrofilnim, veća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom je očekivana (Sricharoen i sur., 2015). Ružmarinska kiselina jedna je od najčešćih u vodi topljivih fenolnih spojeva porodice biljaka *Lamiaceae* (Khojasteh i sur., 2014). Antioksidacijska aktivnost ružmarinske kiseline i derivata kafeinske kiseline pokazala se većom u odnosu na aktivnost flavonoida (Pacifico i sur., 2015). Chou i suradnici (2019), u svom istraživanju povezanosti sastava ekstrakta dobričice s antioksidacijskim i protuupalnim djelovanjem, također su kao dominantan polifenolni spoj istaknuli ružmarinsku kiselinu (1397,90 mg/100 g ekstrakta). Djelovanje ekstrakta dobričice, koje je rezultiralo smanjenjem stanične upale putem smanjenja razina reaktivnih kisikovih vrsta i ekspresije proupalnih gena, može se povezati s polifenolnim komponentama koje sadrži. Slične rezultate u svom radu dobili su Belščak-Cvitanović i suradnici (2014) pri čemu je udio ukupnih polifenola u ekstraktu dobričice iznosio 27,55 mg GAE g⁻¹ s.tv., dok je u radu Oalđe i suradnika (2021) bio skoro dvostruko veći i iznosio je 47,50 mg GAE g⁻¹ s.tv., što može biti posljedica različitih uvjeta poput lokacije i vremena berbe te količine svjetlosti (Varga i sur., 2016). Zabilježena je i nešto niža vrijednost

antioksidacijskog kapaciteta, izmjerenog ABTS metodom, koja je iznosila 2,74 mmol Trolox L⁻¹, dok je udio ružmarinske kiseline iznosio 3236,56 µg g⁻¹ s.tv. (Belščak-Cvitanović i sur., 2014). Navedeni rezultati ukazuju na potencijal koji dobričica ima u obogaćivanju prehrambenih proizvoda prirodnim antioksidansima.

4.2. INKAPSULACIJSKA UČINKOVITOST HIDROGEL ČESTICA

Na slici 5 prikazana je inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola i ružmarinske kiseline u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom dobričice pripremljenih ionskim geliranjem primjenom različitih sastava nosača za inkapsulaciju.



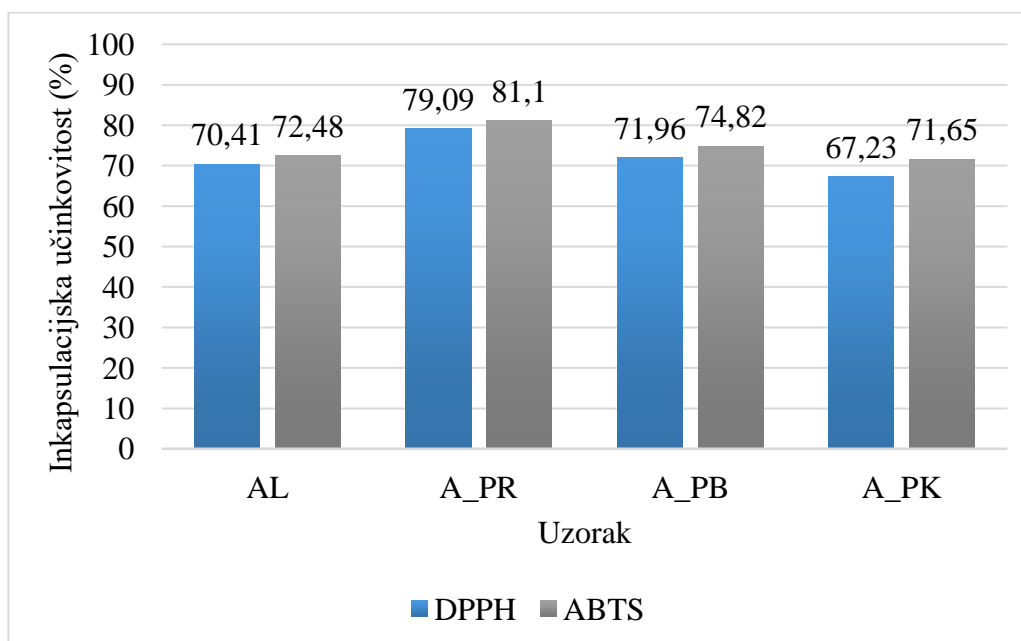
AL-hidrogel čestice na bazi čistog alginata; A_PR-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina riže; A_PB-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina bundeve; A_PK-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina kikirikija

Slika 5. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) i ružmarinske kiseline (RK) u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom dobričice

Učinkovitost inkapsulacije jedan je od najvažnijih pokazatelja efikasnosti očuvanja i zadržavanja bioaktivnih spojeva unutar strukture mreže alginatnog gela. Usporedbom rezultata najveću inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola pokazuju sustavi koji su pripremljeni s čistim alginatom (75,15 %) te alginatom i proteinima riže (A_PR; 84,06 %). Kod hidrogel čestica pripremljenih s alginatom i proteinima bundeve (65,20 %) te alginatom i proteinima kikirikija (62,12 %) vidljiva je sličnost u učinkovitosti inkapsulacije te je razlika neznatna.

Na slici 5 prikazana je i učinkovitost inkapsulacije ružmarinske kiseline, kao najzastupljenije fenolne kiseline ekstrakta dobričice, u sustave različitih nosača na bazi alginata. Kao i u slučaju ukupnih polifenola, najveću inkapsulacijsku učinkovitost pokazuje sustav pripremljen s alginatom i proteinima riže. Kod sustava pripremljenog s čistim alginatom učinkovitost inkapsulacije ružmarinske kiseline (62,44 %) manja je u odnosu na učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola (75,15 %). Sustavi pripremljeni s alginatom i proteinima bundeve (63,54 %) te proteinima kikirikija (61,57 %) pokazuju inkapsulacijsku učinkovitost ružmarinske kiseline sličnu sustavu s čistim alginatom. Najmanja učinkovitost inkapsulacije, i ukupnih polifenola (62,12 %) i ružmarinske kiseline (61,57 %), vidljiva je kod sustava pripremljenog s alginatom i proteinima kikirikija.

Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta prikazana je na slici 6.



AL-hidrogel čestice na bazi čistog alginata; A_PR-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina riže; A_PB-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina bundeve; A_PK-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina kikirikija

Slika 6. Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta, određenog ABTS i DPPH metodama, u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom dobričice

Na slici 6 vidljiv je sličan trend kao i kod inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola i ružmarinske kiseline. Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metoda najveća je kod sustava pripremljenog s alginatom i proteinima riže (ABTS- 81,10 %, DPPH- 79,09 %), dok je najmanja kod sustava s alginatom i

proteinima kikirikija (ABTS- 71,65 %, DPPH- 67,23 %). Iz rezultata se može zaključiti kako dodatak proteina riže i bundeve u sustav alginatnog nosača povećava sposobnost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, s izuzetkom proteina kikirikija. Također, vidljiva razlika u rezultatima dobivenih ovim dvjema metodama može se objasniti činjenicom da se za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koriste različiti slobodni radikali te da dolazi do različitih reakcija između slobodnih radikala i antioksidansa u uzorcima, što ovisi i o strukturi polifenolnih spojeva (Kopjar i sur., 2013).





Belščak-Cvitanović i suradnici (2015) u istraživanju inkapsulacijske učinkovitosti ekstrakta zelenog čaja i polifenolnih komponenata (flavan-3-ola) koristili su različite sustave alginatnih nosača u kombinaciji s proteinima, među kojima su bili i proteini soje i konoplje. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola unutar hidrogel čestica sa sustavom nosača alginata i proteina soje (A_PS) iznosila je 70,25 %, dok je sa sustavom nosača alginata i proteina konoplje (A_PKON) iznosila 71,42 %, što je manje od vrijednosti za A_PR, ali približno slično ostalima (AL, A_PB, A_PK). Učinkovitost inkapsulacije flavan-3-ola, kao predstavnika polifenola zelenog čaja, bila je približno jednaka za oba sustava i iznosila je oko 62 %. Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta iznosila je 49,53 % (A_PS) i 69,23 % (A_PKON), što je manje u odnosu na vrijednosti sustava s čistim alginatom te alginatom i proteinima koji su istraživani u ovome radu. Proteini riže svojim svojstvima predstavljaju odgovarajući izbor prilikom inkapsulacije polifenolnih biljnih ekstrakata.

Povećanju inkapsulacijske učinkovitosti u sustavima s dodatkom proteina, doprinose interakcije, jake hidrofobne i vodikove veze, koje se uspostavljaju između proteina i polifenola. Fenolna skupina djeluje kao dobar donor vodika i na taj način uspostavlja vezu s karboksilnom skupinom proteina (Li i sur., 2009). Na uspostavu interakcija između proteina i polifenola utječu mnogi čimbenici kao što su molekulska masa, metilacija, hidroksilacija, glikozilacija i hidrogenacija polifenola. Da bi afinitet polifenola za vezanje proteina bio što veći, polifenoli moraju biti dovoljno mali da bi penetrirali kroz mrežu proteinskih molekula i dovoljno veliki kako bi se s proteinima povezali na što više mjesta (Ozidal i sur., 2013). Osim afiniteta proteina i polifenola za međusobnu uspostavu veza, moguće je povezivanje i proteina s polisaharidima. U tom slučaju proteini će se ionskim interakcijama vezati sa slobodnom karboksilnom skupinom polimera (Jyothi i sur., 2010). Također, proteinski prah riže, koji je korišten za pripremu sustava nosača A_PR, u svom sastavu ima najveći udio proteina (83,00 %), što može utjecati na uspostavu jačih veza i veću inkapsulacijsku učinkovitost u odnosu na ostale sustave nosača.

4.3. VELIČINA I BOJA HIDROGEL ČESTICA

Hidrogel česticama pripremljenima s alginatom te različitim kombinacijama alginata i proteina, kao nosača za inkapsulaciju polifenola ekstrakta dobričice, izmjereni su veličina, parametri boje i ukupna promjena boje. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Izgled, veličina i parametri boje (L^* , a^* , b^*) hidrogel čestica

Uzorak	Izgled	Veličina (mm)	L^*	a^*	b^*	ΔE
AL		$1,8 \pm 0,0$ mm	$60,66 \pm 0,96$	$-0,15 \pm 0,08$	$5,17 \pm 0,86$	/
A_PR		$1,8 \pm 0,0$ mm	$40,88 \pm 0,15$	$3,65 \pm 0,11$	$10,74 \pm 0,93$	$20,92 \pm 0,24$
A_PB		$2,0 \pm 0,0$ mm	$51,37 \pm 0,80$	$-0,31 \pm 0,08$	$12,27 \pm 0,58$	$11,74 \pm 0,32$
A_PK		$1,8 \pm 0,0$ mm	$46,24 \pm 0,40$	$2,56 \pm 0,09$	$7,87 \pm 0,19$	$14,92 \pm 0,34$

AL-hidrogel čestice na bazi čistog alginata; A_PR-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina riže; A_PB-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina bundeve; A_PK-hidrogel čestice na bazi alginata i proteina kikirikija

Od parametara boje izmjerene su vrijednosti parametara L^* (svjetlina), a^* (a^* - crveno, $-a^*$ -zeleno), b^* (b^* - žuto, $-b^*$ -plavo). Vrijednosti parametra L^* bliže nuli označavaju tamniji uzorak ($L^*=0$, crno), dok one veće označavaju svjetliji ($L^*=100$, bijelo) (Ibraheem i sur., 2012).

Kako je prikazano u tablici 5, hidrogel čestice međusobno su slične veličine. Čestice A_PB nešto su veće (2,0 mm) od ostalih (1,8 mm). Može se zaključiti kako su veličina i inkapsulacijska učinkovitost hidrogel čestica obrnuto proporcionalni budući da su čestice A_PB pokazale najmanju inkapsulacijsku učinkovitost prema svim parametrima. Općenito, poželjnije su čestice manje veličine radi lakše kasnije primjene i implementacije u prehrambene i druge proizvode. Očekivana veličina čestica pripremljenih ionskim geliranjem je >1 mm (Soliman i sur., 2013; Arriola i sur., 2018).

Usporedbom vrijednosti svjetline, prikazanih u tablici 5, vidljivo je kako najmanju imaju hidrogel čestice pripremljene s proteinima riže ($L^*=40,88$), tj. najtamnije su. Vrijednosti sustava pripremljenih s proteinima bundeve ($L^*=51,37$) i kikirikija ($L^*=46,24$) nešto su veće, no još uvijek manje u odnosu na vrijednosti referentnih čestica s čistim alginatom. Prema rezultatima vidljivo je kako su hidrogel čestice pripremljene s čistim alginatom najsvjetlije ($L^*=60,66$).

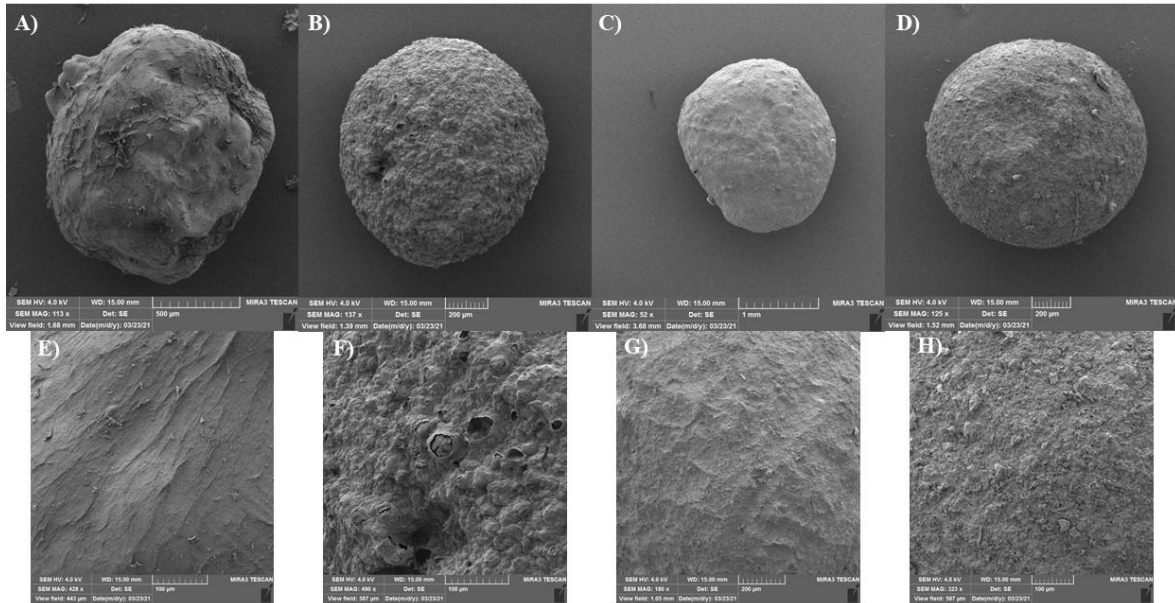
Izmjerene vrijednosti parametra a^* najveće su kod sustava A_PR ($a^*=3,65$) i A_PK ($a^*=2,56$), što upućuje na izraženije crveno obojenje hidrogel čestica. Kod sustava s čistim alginatom te alginata i proteina bundeve vrijednosti su negativnog predznaka što upućuje na zeleno obojenje. Najmanju izmjerenu vrijednost a^* i najizraženije zeleno obojenje imaju hidrogel čestice s proteinima bundeve ($a^*=-0,31$), što je vidljivo i na slici u tablici 5.

Dodatak biljnih proteina u sustav s alginatom rezultira izraženijim žutim obojenjem, na koje ukazuje i porast vrijednosti parametra b^* . Najveća izmjerena vrijednost je kod sustava A_PB ($b^*=12,27$).

Ukupna promjena boje ΔE^* , tj. mjera za razumijevanje sposobnosti ljudskog oka da percipira promjenu boje, izračunata je za hidrogel čestice sa sastavom nosača pojačanim proteinima (A_PR, A_PB, A_PK) u odnosu na referentne čestice, odnosno one pripremljene samo s alginatom. Najveća ukupna promjena boje ΔE^* izračunata je za sustav A_PR ($\Delta E^*=20,92$), dok je najmanja promjena boje izražena kod sustava A_PB ($\Delta E^*=11,74$). Budući da se vrijednosti ukupne promjene boje svih čestica nalaze u rasponu između 11 i 49, može se reći kako se boje percipiraju više kao slične nego različite (Anonymous 3, 2021).

4.4. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE HIDROGEL ČESTICA

Morfološke karakteristike hidrogel čestica određene su na temelju mikroskopskih slika, dobivenih skenirajućim elektronskim mikroskopom, prikazanih na slici 7.



Slika 7. SEM slike hidrogel čestica: A) hidrogel čestice na bazi čistog alginata (AL); B) hidrogel čestice na bazi alginata i proteina riže (A_PR); C) hidrogel čestice na bazi alginata i proteina bundeve (A_PB); D) hidrogel čestice na bazi alginata i proteina kikirikija (A_PK). Mikroskopske slike morfologije površina hidrogel čestica: E) AL; F) A_PR; G) A_PB; H) A_PK

Ionskim geliranjem formiraju se hidrogel čestice sferičnog oblika, kojima se, uslijed sušenja liofilizacijom, mijenjaju morfološke karakteristike i struktura. Promatranjem slika vidljiv je karakteristični sferični oblik hidrogel čestica. Manja pravilnost oblika u odnosu na ostale čestice vidljiva je kod čestica dobivenih čistim alginatom. Vidljiva je i razlika u teksturi i hrapavosti površine hidrogel čestica. Površina čestica dobivenih čistim alginatom je glatkije teksture, s manje pukotina i nepravilnosti, u odnosu na ostale. Najveća heterogenost površine s najviše pukotina vidljiva je kod čestica pripremljenih kombinacijom alginata i proteina riže. Do promjene oblika i povećanja heterogenosti površine te pojave pukotina dolazi uslijed slabljenja i destabilizacije gel mreže te promjene strukture pora koje čine alginat i kalcijevi ioni (Lopez Cordoba, 2014). Čimbenici koji još utječu na oblik i teksturu površine čestica su sastav nosača i koncentracija gelirajućeg medija. Čestice pripremljene s većom koncentracijom CaCl_2 ispoljavaju poželjnije morfološke karakteristike, što se može objasniti jačom vezom između kalcijevih iona i alginata koja čini kalcij-alginat mrežu snažnijom i manje podložnom promjenama uslijed procesa sušenja (Lee i sur., 2013).

4.5. UČINKOVITOST LIPOSOMALNE INKAPSULACIJE

Učinkovitost liposomalne inkapsulacije za ukupne polifenole, ružmarinsku kiselinu i antioksidacijski kapacitet prikazana je u tablici 6.

Tablica 6. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) i ružmarinske kiseline te učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta (%) metodama ABTS i DPPH u liposomima sa inkapsuliranim polifenolnim ekstraktom dobričice

Inkapsulacijska učinkovitost (%)			
UP	ABTS	DPPH	Ružmarinska kiselina
94,66 ± 0,38	93,17 ± 0,58	93,26 ± 1,20	97,64 ± 0,25

Prema rezultatima prikazanim u tablici 6 liposomalna inkapsulacijska učinkovitost polifenola ekstrakta dobričice (94,66 %), kao i najzastupljenijeg polifenola – ružmarinske kiseline (97,64 %), izrazito je visoka. Također, učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, određenoga metodama ABTS (93,17 %) i DPPH (93,26 %), visoka je i odražava polifenolni sastav kojim ekstrakt dobričice obiluje. Brojna su istraživanja upotrebljavala liposome za inkapsulaciju biljnih ekstrakata te su rezultirala visokim vrijednostima inkapsulacijske učinkovitosti. Zabilježene liposomalne inkapsulacijske učinkovitosti ekstrakta troškota (*Polygonum aviculare* L.) (83 %) (Soon i sur., 2005), sladića (*Glycyrrhiza glabra* L.) (84 %) (Castangia i sur., 2015) i lista goji (*Lycium barbarum* L.) (84,60 %) (Pāvāloiu i sur., 2021) vrlo su visoke. U istraživanju Sinica i suradnika (2005) inkapsulacijska učinkovitost ekstrakta pelina (*Artemisia arborescens* L.) bila je nešto niža (74 %) u odnosu na prethodno navedene. Općenito, učinkovitost inkapsulacije razlikuje se ovisno o sastavu liposoma, veličini te prirodi unutrašnje površine liposoma (Baranauskaite i sur., 2018). U istraživanju koje su proveli Baranauskaite i suradnici (2018) ispitivan je utjecaj sastava liposoma na inkapsulacijsku učinkovitost ekstrakta origana. Korišteni liposomi bili su pripremljeni s fosfoliponom 90H (P90H) i dimiristoilfosfatidilglicerolom (DMPG). Inkapsulacijska učinkovitost ružmarinske kiseline bila je između 65 % (P90H) i 90 % (P90H:DMPG=1:1), što ukazuje na utjecaj sastava liposoma na učinkovitost inkapsulacije. Također, istraživanja navode kako na smanjenje

učinkovitosti inkapsulacije mogu utjecati vodikove veze koje polifenoli uspostavljaju s dvoslojem fosfolipida i time narušavaju fluidni prostor dvosloja (Rafiee i sur., 2017). Prema ovim podacima metoda liposomalne inkapsulacije ekstrakta dobričice je učinkovita te ima veliki potencijal za daljnju primjenu u obogaćivanju prehrambenih proizvoda polifenolnim spojevima.

4.6. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA

Izmjereni su veličina, indeks polidisperzije (PDI) i zeta potencijal praznih liposoma i liposoma s inkapsuliranim ekstraktom dobričice te su rezultati prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Veličina, indeks polidisperzije i zeta potencijal liposoma

Uzorak	Veličina (nm)	Indeks polidisperzije	Zeta potencijal (mV)
Prazni liposomi	192,9 ± 4,6	0,329 ± 0,004	-27,98 ± 0,98
Liposomi s ekstraktom	106,7 ± 0,9	0,211 ± 0,012	-21,17 ± 0,46

Indeks polidisperzije (PDI) mjera je raspodjele veličine čestica i homogenosti sustava, čije su prihvatljive vrijednosti manje od 0,7 (Refai i sur., 2017). Liposomi s inkapsuliranim ekstraktom dobričice homogeniji su (PDI= 0,211) i manji (106,7 nm) od praznih liposoma (PDI= 0,329; veličina= 192,9 nm). Veličina obiju liposomalnih suspenzija veća je od 100 nm, što ukazuje na postojanje najmanje dva dvosloja u strukturi liposoma (Bryla i sur., 2015). Također, vrijednosti indeksa polidisperzije veće su od 0,1, što ukazuje na polidisperznu raspodjelu veličine liposoma (Raval i sur., 2019). Zeta potencijal parametar je koji predstavlja površinski naboj čestica. Budući da su liposomi nabijeni, međusobno se odbijaju, čime sprječavaju agregaciju i održavaju stabilnost suspenzije. Vrijednosti zeta potencijala veće od 30 mV i manje od -30 mV ukazuju na odgovarajuću stabilnost suspenzije (Kanasova i sur., 2017). Prema dobivenim vrijednostima zeta potencijala prazni liposomi (-27,98 mV) stabilniji su od liposoma s inkapsuliranim ekstraktom (-21,17 mV).

5. ZAKLJUČCI

1. Ružmarinska kiselina je najzastupljeniji polifenolni spoj vodenog ekstrakta dobričice.
2. Među formuliranim hidrogel česticama, čestice sa sustavom alginatnog nosača s proteinima riže pokazale su najveću učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i ružmarinske kiseline.
3. Dodatak proteina u sustav nosača na bazi alginata rezultirao je povećanjem učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na čisti alginat, osim u slučaju dodatka proteina kikirikija.
4. Dodatak proteina u sustav alginatnog nosača rezultirao je tamnijom bojom hidrogel čestica, dok je najveću ukupnu promjenu boje uzrokovao dodatak proteina riže.
5. Hidrogel čestice sa sustavom nosača od alginata i proteina pokazale su visoku sferičnost i pravilniji oblik u odnosu na hidrogel čestice sa sustavom nosača od čistog alginata. No, hidrogel čestice sa sustavom nosača od čistog alginata imale su glatkiju i homogeniju površinsku teksturu od čestica s dodatkom proteina.
6. Učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i ružmarinske kiseline liposoma bila je veća od učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola i ružmarinske kiseline hidrogel čestica sa sustavom nosača od alginata i proteina riže.
7. Liposomi s inkapsuliranim ekstraktom dobričice bili su manji i homogeniji od praznih liposoma, no prazni liposomi su imali manju vrijednost zeta potencijala i time bili stabilniji.

6. LITERATURA

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, i sur. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* **8**, 102. doi:10.1186/1556-276x-8-102

Amine KM, Champagne CP, Raymond Y, St-Gelais D, Britten M, Fustier P, i sur. (2014) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control* **37**, 193–199. <https://doi.org/10.3390/nu7042469>

An HJ, Jeong HJ, Um JY, Kim HM, Hong SH (2006) *Glechoma hederacea* inhibits inflammatory mediator release in IFN- γ and LPS-stimulated mouse peritoneal macro-phages. *J Ethnopharmacol* **106**, 418 – 424. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.024>

Anonymous 1 <<https://www.plantea.com.hr/dobricica/>> Pristupljeno 15. prosinca 2021.

Anonymous 2 <<https://www.scimed.co.uk/education/sem-scanning-electron-microscopy/>> Pristupljeno 15. prosinca 2021.

Anonymous 3 <<http://zschuessler.github.io/DeltaE/learn/#toc-defining-delta-e>> Pristupljeno 4. listopada 2021.

Arriola NDA, Chater PI, Wilcox M, Lucini L, Roccheti G, Dalmine M, i sur. (2018) Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation – Effects of alginate blends and gelling solution on the polyphenolic profile. *Food Chem* **275**, 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.086>

Augustin MA, Hemar Y (2009) Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev* **38**, 902 – 912. <https://doi.org/10.1039/B801739P>

Baranauskaite J, Duman G, Corapcıoğlu G, Baranauskas A, Taralp A, Ivanauskas L, i sur. (2018) Liposomal incorporation to improve dissolution and stability of rosmarinic acid and

carvacrol extracted from oregano (*O. onites* L.). *Biomed Res Int* **2018**, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/6147315>

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. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0071>

Belščak-Cvitanović A, Đorđević V, Karlović S, Pavlović V, Komes D, Ježek D, i sur. (2015) Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract. *Food Hydrocoll* **51**, 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.039>

Benita S (2006) *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, 2. izd., Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA.

Bozzuto G, Molinari A (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* **10**, 975-999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* **28**, 25 – 30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Bravo L (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* **56**, 317–333. doi:10.1111/j.1753-4887.1998.tb01

Bryła A, Lewandowicz G, Juzwa W (2015) Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *J Food Eng* **167**, 189 - 195. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.025>

Castangia I, Caddeo C, Manca ML, Casu L, Latorre AC, Díez-Sales O, i sur. (2015) Delivery of liquorice extract by liposomes and hyalurosomes to protect the skin against oxidative stress injuries. *Carbohydr Polym* **134**, 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.037>

Chao WW, Liou YJ, Ma HT, Chen YH, Chou S (2021) Phytochemical composition and bioactive effects of ethyl acetate fraction extract (EAFE) of *Glechoma hederacea* L. *J Food Biochem* **45**, e13815. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13815>

Cheynier V (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* **81**, 223 – 229. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>

Chou ST, Lin TH, Peng HY, Chao WW (2019) Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Life Sci* **231**, 116519. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.075>

Cocero MJ, Martín A, Mattea F, Varona S (2009) Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *J Supercrit Fluids* **47**, 546 – 555. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.015>

Dangles O (2006) The physico-chemical properties of polyphenols. How do they relate to their roles in plants, foods and human health. *Agro Food Ind Hi Tech* **17**, 64 – 67.

Davarcı F, Turan D, Ozcelik B, Poncelet D (2017) The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocoll* **62**, 119 – 127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.029>

De Moura SCSR, Berling CL, Garcia AO, Queiroz MB, Alvim ID, Hubinger MD (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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.010>

De Moura SCSR, Schettini GN, Garcia AO, Gallina DA, Alvim ID, Hubinger MD (2019) Stability of hibiscus extract encapsulated by ionic gelation incorporated in yogurt. *Food Bioprocess Tech* **12**, 1500 – 1515. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02308-9>

Desai KGH, Park HJ (2005) Recent developments in micro-encapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **23**, 1361-1394. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>

Döring AS, Petersen M (2014) Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochem Lett* **10**, 111-117. doi: 10.1016/j.phytol.2014.05.012.

El Khawand T, Courtois A, Valls J, Richard T, Krisa S (2018) A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochem Rev* **17**, 1007 – 1029. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9578-9>

Fang Z, Bhandari B (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci Technol* **21**, 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M (2012) Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci Technol* **23**, 13 – 27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>

Funami T, Fang Y, Noda S, Ishihara S, Nakauma M, Draget KI, i sur. (2009) Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocoll* **23**, 1746 – 1755. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.014>

Giunchedi P, Conte U (1995) Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: An overview. *S.T.P. Pharma Prat.* **5**, 276 – 290.

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 bioaccessibility studies. *Food Chem* **201**, 205 – 212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.091>

Gulzar S, Benjakul S, Hozzein WN (2020) Impact of β-glucan on debittering, bioaccessibility and storage stability of skim milk fortified with shrimp oil nanoliposomes. *Int J Food Sci Technol* **55**, 2092–2103. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.14452>

Heck RT, Vendruscolo RG, de Araújo Etchepare M, Cichoski AJ, de Menezes CR, Barin JS, i sur. (2017) Is it possible to produce a low-fat burger with a healthy n – 6/n – 3 PUFA ratio without affecting the technological and sensory properties? *Meat Sci* **130**, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.03.010>

Husseini GA, Awad N, Abbas Y (2018) The Potential of Ultrasound Technology and Chemotherapy Carriers in Breast Cancer Treatment. *Al Qasimi Foundation Policy Paper Series* **26**, 1-7. <https://doi.org/10.18502/aqf.0059>

Hwang JK, Erkhembaatar M, Gu DR, Lee CH, Shin DM, Lee YR, i sur. (2014) Glechoma hederacea suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis. *J Dental Res* **93**, 685 – 690. <https://doi.org/10.1177%2F0022034514536579>

Ibraheem NA, Hasan MM, Khan RZ, Mishra PK (2012) Understanding color models: A review. *ARPN Journal of Science and Technology* **2**, 265-275.

Jafari SM, Vakili S, Dehnad D (2019) Production of a functional yogurt powder fortified with nanoliposomal vitamin D through spray drying. *Food Bioprocess Technol* **12**, 1220–1231. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-019-02289-9>

Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY (2010) Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul* **27**, 187–197. <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>

Kairam N, Kandi S, Sharma M (2021) Development of functional bread with flaxseed oil and garlic oil hybrid microcapsules. *LWT* **136**, 110300. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110300>

Kanášová M, Nesměrák K (2017) Systematic review of liposomes' characterization methods. *Monatsh Chem* **148**, 1581-1593. <http://dx.doi.org/10.1007/s00706-017-1994-9>

Khojasteh A, Mirjalili MH, Hidalgo D, Corchete P, Palazon J (2014) New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnol Lett* **36**, 2393–2406. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1640-0>

Kiani A, Fathi M, Ghasemi SM (2017) Production of novel vitamin D3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification. *Int J Food Properties* **20**, 2466–2476. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1240690>

Kim J, Song S, Lee I, Kim Y, Yoo I, Ryoo I, i sur. (2011) Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *Longituba*. *Bioorganic Med Chem Lett* **21**, 3483 – 3487. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.002>

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.

Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD (2002) Biological activity of *Glechoma hederacea*. *Fitoterapia* **73**, 721 – 723. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00237-x](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00237-x)

Kumarasamy Y, Nahar L, Kong-Thu-lin P, Jaspars M, Sarker SD (2006) Hederacine A and Hederacine B from *Glechoma hederacea* Inhibit the Growth of Colorectal Cancer Cells in vitro. *Nat Prod Commun* **1**, 33-35. doi:10.1177/1934578x0600100106.

Kühn H, Wiesner R, Alder L, Schewe T (1989) Occurrence of free and esterified lipoxygenase products in leaves of *Glechoma hederacea* L. and other Labiatae. *Eur J Biochem* **186**, 155 – 62. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15190.x>

Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D (2008) Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions. U: Daayf F, Lattanzio V (ured.) *Recent Advances in Polyphenols Research*, 1. izd., Wiley-Blackwell, Oxford, str. 1 – 35.

Lee KH, Lee JS, Kim ES, Lee HG (2018) Preparation, characterization, and food application of rosemary extract-loaded antimicrobial nanoparticle dispersions. *LWT* **101**, 138-144. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.072>

Leong JY, Lam WH, Ho KW, Voo WP, Lee MFX, Lim HP, i sur. (2016) Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle

designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology* **24**, 44 – 60. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2015.09.004>

Li Y, Lim LT, Kakuda Y (2009) Electrospun Zein Fibers as Carriers to Stabilize (–)-Epigallocatechin Gallate. *J Food Sci* **74**, C233–C240. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01093.x>

Liu RH (2013) Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *J Food Sci* **78**, A18-A25. doi:10.1111/1750-3841.12101.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=37707>> Pristupljeno 31. 7. 2021.

Ma T, Zhu H, Wang J, Wang Q, Yu L, Sun B (2017) Influence of extraction and solubilizing treatments on the molecular structure and functional properties of peanut protein. *LWT - Food Sci Technol* **79**, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.037>

Marsanasco M, Piotrkowski B, Calabró V, del Valle Alonso S, Chiaramoni NS (2015) Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: thermal stability, rheological and organoleptic properties. *J Food Sci Technol* **52**, 7828 –7838. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13197-015-1924-y>

Milovanović M, Živković D, Vučelić-Radović B (2010) Antioxidant effects of *Glechoma hederacea* as a food additive. *Nat Prod Commun* **5**, 61 – 63. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1000500116>

Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A (2007) The Essential Oil of Ground Ivy (*Glechoma hederacea*L) Growing Wild In Eastern Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* **19**, 449–451. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.96999>

Munin A, Edwards-Lévy F (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **3**, 793 – 829. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics3040793>

Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V (2013) Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *Ind Crops Prod* **42**, 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**, 418 – 425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>

Oalđe M, Kolarević S, Živković J, Alimpić Aradski A, Jovanović Marić J, Kračun Kolarević M, i sur. (2021) A comprehensive assessment of the chemical composition, antioxidant, genoprotective and antigenotoxic activities of Lamiaceae species using different experimental models in vitro. *Food & Function*, **12**, 3233–3245. <http://dx.doi.org/10.1039/d1fo00447f>

Ough CS, Amerine MA (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley & Sons, New York, str. 196 – 221.

Ozdamar T, Capanoglu E, Altay F (2013) A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res Int* **51**, 954–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>

Pacifico S, Galasso S, Piccolella S, Kretschmer N, Pan SP, Marciano S (2015) Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Res Int* **69**, 121–132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.019>

Paques JP, Sagis LM, van Rijn CJ, van der Linden E (2014) Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO₃. *Food Hydrocoll* **40**, 182 – 188. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.02.024>

Păvăloiu R-D, Sha'at F, Neagu G, Deaconu M, Bubueanu C, Albulescu A, i sur. (2021) Encapsulation of polyphenols from *Lycium barbarum* leaves into liposomes as a strategy to improve their delivery. *Nanomaterials* **11**, 1938. <https://dx.doi.org/10.3390/nano11081938>

Phoem A, Chanthachum S, Voravuthikunchai S (2015) Applications of Microencapsulated Bifidobacterium Longum with Eleutherine Americana in Fresh Milk Tofu and Pineapple Juice. *Nutrients*, **7**, 2469–2484. <https://doi.org/10.3390/nu7042469>

Qiao Z, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Flores MJ, Gao L, i sur. (2012) Anti-Melanogenesis Effect of Glechoma hederacea L. Extract on B16 Murine Melanoma Cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 1877–1883. <https://doi.org/10.1271/bbb.120341>

Quintero J, Naranjo A, Ciro G, Rojas J (2017) Vegetable proteins: non-sensitizing encapsulation agents for bioactive compounds. U: Athari SS (ured.) Allergen, 1.izd., IntechOpen, London, str. 43-65. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70378>

Racoviță S, Vasiliu S, Popa M, Luca C (2009) Polysaccharide based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie* **54**, 709–718.

Rafiee Z, Barzegar M, Sahari MA, Maherani B (2017) Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chem* **220**, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.207>

Rashidinejad A, Birch EJ, Sun-Waterhouse D, Everett DW (2014) Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chem* **156**, 176 – 183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.115>

Rasti B, Erfanian A, Selamat J (2017) Novel nanoliposomal encapsulated omega-3 fatty acids and their applications in food. *Food Chem* **230**, 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.089>

Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK (2019) Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. U: Tekade RK (ured.) Basic Fundamentals of Drug Delivery, 1. izd., Academic Press, London, str. 369-400.

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 Radic Biol Med* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Refai H, Hassan D, Abdelmonem R (2017) Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Deliv* **24**, 278-288. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1247925>

Reza Mozafari M, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C (2008) Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J Liposome Res* **18**, 309 – 327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>

Rezig L, Riaublanc A, Chouaibi M, Guéguen J, Hamdi S (2015) Functional Properties of Protein Fractions Obtained from Pumpkin (*Cucurbita Maxima*) Seed. *Int J Food Prop* **19**, 172–186. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1020433>

Robbins RJ (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem* **51**, 2866 – 2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>

Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Toledo E, Delgado-Rodríguez M, Gaforio J (2019) Naturally lignan-rich foods: A dietary tool for health promotion? *Molecules* **24**, 917. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules24050917>

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* **93**, 570 – 572. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.016>

Silva de Azevedo E, Zapata Noreña CP (2021) External ionic gelation as a tool for the encapsulation and stability of betacyanins from *Bougainvillea glabra* bracts extract in a food model. *J Food Process Preserv* **45**, e15637. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15637>

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**, 287 – 306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>

Schäfer V, von Briesen H, Andreesen R, Steffan AM, Royer C, Tröster S, i sur. (1992) Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. *Pharmaceutical Res* **9**, 541-546. <https://doi.org/10.1023/a:1015852732512>

Shahidi F, Han XQ (1993) Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr* **33**, 501-547. <https://doi.org/10.1080/10408399309527645>

Silverio GB, Sakanaka LS, Alvim ID, Shirai MA, Grosso CRF (2018) Production and characterization of alginate microparticles obtained by ionic gelation and electrostatic adsorption of concentrated soy protein. *Ciênc Rural* **48**, e20180637. doi:10.1590/0103-8478cr2018063

Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rougé P, Van Damme EJM, Alvarez RA, i sur. (2006) Carbohydrate specificity of an insecticidal lectin isolated from the leaves of *Glechoma hederacea* (ground ivy) towards mammalian glycoconjugates. *Biochem J* **393**, 331 – 41. <https://doi.org/10.1042/BJ20051162>

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Meth Enzymol* **299**, 1179. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999b) Flavanoids and other polyphenols. *Meth Enzymol* **299**, 152.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144 - 158. <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.full.pdf+html>

Sinico C, De Logu A, Lai F, Valenti D, Manconi M, Loy G, i sur. (2005) Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *Eur J Pharm Biopharm* **59**, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.06.005>

Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H (2012) Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today* **17**, 160 – 166. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.015>

Soliman EA, El-Moghazy Y, El-Din MSM, Massoud MA (2013) Microencapsulation of essential oil within alginate: Formulation and *in vitro* evaluation of antifungal activity. *J Encapsulation Adsorpt Sci* **3**, 48-55. <http://dx.doi.org/10.4236/jeas.2013.31006>

Soon SK, Sun YK, Bong JK, Kyeong JK, Geun YN, Na RI, i sur. (2005) Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of *Polygonum aviculare* L. extract. *Int J Pharm* **483**, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.030>

Sricharoen P, Techawongstein S, Chanthai S (2015) Determination of lipophilic and hydrophilic antioxidant activities in the crude extracts of ten varieties of tomatoes. *Asia-Pac J Sci Technol* **20**, 66 – 74. <http://dx.doi.org/10.14456/kkurj.2015.7>

Sun-Waterhouse D, Wadhwa, SS (2013) Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: a review. *Food Bioprocess Technol* **6**, 607 – 627. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs11947-012-0829-2>

Šeremet D, Vugrinec K, Petrović P, Butorac A, Kuzmić S, Vojvodić Cebin A, i sur. (2022) Formulation and characterization of liposomal encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plant mountain germander (*Teucrium montanum* L.) for the incorporation into coffee drinks. *Food Chem* **370**, 131257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131257>

Škrovánková S, Mišurcová L, Machů L (2012) Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Adv Food Nutr Res* **67**, 75 – 139. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394598-3.00003-4>

Tan HW, Misran M (2013) Polysaccharide-anchored fatty acid liposome. *Int J Pharm* **441**, 414 – 423. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.013>

Vandamme TF, Poncelet D, Subra-Paternault P (2007) *Microencapsulation: des sciences aux technologies*, 1. izd., Lavoisier Tec & Doc, Paris.

Varga L, Engel R, Szabó K, Abrankó L, Gosztola B, Németh É, i sur. (2016) Seasonal Variation in Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Glechoma Hederacea* L. Harvested from Six Hungarian Populations. *Acta Aliment* **45**, 268-276. <http://dx.doi.org/10.1556/066.2016.45.2.14>

Wang YY, Lin SY, Chen WY, Liao SL, Wu CC, Pan PH, i sur. (2017) *Glechoma hederacea* extracts attenuate cholestatic liver injury in a bileduct-ligated rat model. *J Ethnopharmacol* **204**, 58 – 66. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.011>

Yeo Y, Baek N, Park K (2001) Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol Bioprocess Eng* **6**, 213 – 230. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02931982>

Yesil-Celiktas O, Girgin G, Orhan H, Wichers HJ, Bedir E, Vardar-Sukan F (2007) Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *Eur Food Res Technol* **224**, 443 – 451. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0306-0>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MARTINA ŠTEFANČIĆ 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.

Martina Štefančić

Vlastoručni potpis

