

Optimiranje i in vitro probava emulgiranih biljnih ekstrakata ružmarina i origana

Sirovec, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:447553>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Sara Sirovec

**OPTIMIRANJE I *in vitro* PROBAVA
EMULGIRANIH BILJNIH
EKSTRAKATA RUŽMARINA I
ORIGANA**

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Tamari Jurina na velikoj pomoći prilikom izrade ovog rada te na pristupačnosti i ugodnoj suradnji. Također, zahvaljujem i izv.prof.dr.sc. Maji Benković na pomoći.

Posebno hvala najzabavnijim cimericama uz koje su danonoćna učenja bila podnošljivija te Karlu, bratu i svim prijateljima na potpori, razumijevanju i dijeljenju slatkih muka studiranja. A najveće hvala roditeljima na velikoj pomoći i podršci tijekom cijelog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

OPTIMIRANJE I *in vitro* PROBAVA EMULGIRANIH BILJNIH EKSTRAKATA RUŽMARINA I ORIGANA

Sara Sirovec, univ. bacc. nutr. 58213004

Sažetak: Ružmarin i origano mediteranske su biljke čija se konzumacija sve više preporuča zbog brojnih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje zbog mnoštva fenolnih spojeva koje posjeduju. Međutim, prolaskom kroz gastrointestinalni trakt, biodostupnost tih spojeva se značajno smanjuje zbog promjene pH vrijednosti, ali i prisutnosti probavnih enzima. Jedan od načina očuvanja biodostupnosti fenolnih spojeva je proces emulgiranja biljnih ekstrakata. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj koncentracije emulgatora (komercijalni protein graška), koncentracije ulja i brzine miješanja na kemijska svojstva (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost) emulgiranih ekstrakata ružmarina i origana. Optimiranje uvjeta emulgiranja provedeno je metodom odzivnih površina. Nakon što su pripremljene emulzije pri optimalnim uvjetima, provedena je *in vitro* probava vodenih i emulgiranih biljnih ekstrakata te su im određena fizikalna (vodljivost, ukupne otopljene tvari) i kemijska svojstva (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost). Analizom antioksidacijske aktivnosti nakon završene *in vitro* probave postignut je veći stupanj očuvanja emulgiranih biljnih ekstrakata, u odnosu na neemulgirane biljne ekstrakte.

Ključne riječi: optimiranje, *in vitro* probava, fenolni spojevi, emulzije ulje u vodenom ekstraktu biljke

Rad sadrži: 69 stranica, 16 slika, 7 tablica, 74 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Tamara Jurina

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr.sc. Maja Benković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Tamara Jurina (mentor)
3. doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (član)*
4. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjenski član)

Datum obrane: 29. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisatation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

OPTIMISATION AND *in vitro* DIGESTION OF EMULSIONS CONTAINING ROSEMARY AND OREGANO

Sara Sirovec, univ. bacc. nutr. 58213004

Abstract: Rosemary and oregano are Mediterranean plants whose consumption is increasingly recommended because of their numerous positive effects on human health, owing to phenolic compounds they possess. However, by passing through the gastrointestinal tract, the bioavailability of these compounds is significantly reduced: the reasons are the pH change and the presence of digestive enzymes. One of the ways to preserve the bioavailability of phenolic compounds is the emulsification of plant aqueous extracts. Therefore, the aim of this work was to investigate the influence of emulsifier concentration (commercial pea protein), oil concentration and mixing speed on the chemical properties (total polyphenolic content, antioxidant activity) of emulsified extracts of rosemary and oregano. Optimisation of the emulsification conditions was carried out using the response surface methodology. After preparation of the emulsions under optimal conditions, *in vitro* digestion of aqueous and emulsified plant extracts was performed and their physical (conductivity, total dissolved solids) and chemical properties (total polyphenolic content, antioxidant activity) were determined. The results showed that emulsions containing rosemary and oregano extracts exhibited better preservation of antioxidant activity compared to aqueous plant extracts.

Keywords: optimisation, *in vitro* digestion, polyphenolic compounds, emulsions containing plant extracts

Thesis contains: 69 pages, 16 figures, 7 tables, 74 references

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: Tamara Jurina, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Maja Benković, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Maja Benković, PhD, Associate professor (president)
2. Tamara Jurina, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Ana Jurinjak - Tušek, PhD, Assistant professor (member)
4. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 29th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PORODICA BILJAKA USNAČA (Lamiaceae)	3
2.1.1. Ružmarin	3
2.1.1.1. Kemijski sastav ružmarina	3
2.1.2. Origano.....	4
2.1.2.1. Kemijski sastav origana	5
2.2. ANTIOKSIDANSI.....	5
2.2.1. Polifenolni spojevi	6
2.2.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva	7
2.3. EMULZIJE.....	8
2.3.1. Vrste emulzija	8
2.3.2. Mehanizam stvaranja emulzija.....	10
2.3.3. Zeta potencijal.....	10
2.4. MEHANIZAM PROBAVE U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU	11
2.4.1. Probava u ustima	11
2.4.2. Probava u želucu	12
2.4.3. Probava u tankom crijevu	12
2.4.4. Probava u debelom crijevu.....	13
2.4.5. <i>In vitro</i> probava	13
2.4.6. Probava polifenolnih spojeva.....	14
2.4.7. Probava emulgiranih vodenih ekstrakata	14
2.5. PROTEINI GRAŠKA KAO EMULGATORI.....	15
2.6. METODA ODZIVNIH POVRŠINA	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Uzorci.....	18
3.1.2. Aparatura i pribor.....	18
3.1.3. Kemikalije	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Priprema vodenih biljnih ekstrakata origana i ružmarina	20
3.2.2. Priprema suspenzija proteina graška u vodenim ekstraktima ružmarina odnosno	

origana.....	20
3.2.3. Određivanje koncentracije komercijalnog proteina graška Bradfordovom metodom koji sadrži boju Coomassie Brilliant Blue R-250	21
3.2.4. Priprema emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom emulgatora.....	22
3.2.5. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja.....	23
3.2.6. Određivanje fizikalnih svojstava pripremljenih emulzija u vodenim ekstraktima origana i ružmarina	24
3.2.6.1. Određivanje zeta potencijala, vodljivosti te ukupnih otopljenih tvari	24
3.2.6.2. Određivanje prosječnog Feretovog promjera kapljica u emulziji ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana.....	25
3.2.7. <i>In vitro</i> simulacija probavnog sustava.....	25
3.2.8. Određivanje kemijskih svojstava vodenih biljnih ekstrakata i emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana.....	26
3.2.8.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	26
3.2.8.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	27
3.2.8.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	28
3.2.9. Metoda odzivnih površina.....	30
3.2.10. Analiza varijance (ANOVA).....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	31
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA	32
4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENIM EKSTRAKTIMARUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA	35
4.3. REZULTATI OPTIMIRANJA UVJETA EMULGIRANJA S OBZIROM NA KEMIJSKA SVOJSTVA EMULZIJA ULJE U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA	38
4.4. ANALIZA VARIJANCE (ANOVA).....	42
4.5. ODREĐIVANJE PROSJEČNOG FERETOVOG PROMJERA KAPLJICA U EMULZIJAMA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU RUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA	45
4.6. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA I EMULZIJA ULJE U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA NAKON <i>IN VITRO</i> PROBAVE	50
4.7. POSTOTAK PREŽIVLJAVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA S ANTIOKSIDACIJSKOM AKTIVNOŠĆU	58
5. ZAKLJUČCI.....	60
6. LITERATURA.....	61

1. UVOD

U posljednje vrijeme sve je veće zanimanje tržišta za aromatično bilje s područja Mediterana kao što su ružmarin i origano zbog njihova visokog udjela bioaktivnih komponenata te posljedično ljekovitih svojstava. Ove biljke koriste se od davnina kao začini za tradicionalnu mediteransku prehranu te kao lijekovi u narodnoj medicini, a danas se smatraju važnim čimbenicima sigurnosti i kvalitete hrane zbog inhibicije različitih faktora koji utječu na smanjenje njezine kvalitete kao što su oksidacija ili mikrobno kvarenje (Giacometti i sur., 2018).

Origano i ružmarin su biljke bogate polifenolnim spojevima, najraširenijim sekundarnim metabolitima biljke. Predmet su brojnih istraživanja zbog njihovog značajnog antioksidacijskog potencijala te uloge u prevenciji bolesti povezanih s oksidativnim stresom poput karcinoma, zbog čega je u posljednje vrijeme značajan broj istraživanja vezanih uz ljudsko zdravlje usmjeren upravo prema učinkovitoj ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljaka (Dai i Mumper, 2012). Međutim, ograničavajući čimbenik u njihovoj prevenciji nastanka karcinoma, ali i drugih stanja poput starenja, upalnih ili neurodegenerativnih bolesti predstavlja njihova nestabilnost i niska biodostupnost zbog čega ih je potrebno stabilizirati mikroinkapsulacijom ili emulgiranjem. Prednosti procesa emulgiranja uključuju održavanje kemijske stabilnosti i kontroliranog otpuštanja fenolnih spojeva (Lu i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj koncentracije emulgatora, brzine miješanja i udjela ulja u emulziji na stabilnost pripremljenih emulzija ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom komercijalnog proteina graška, kao emulgatora. Emulzijama su određena fizikalna (vodljivost, zeta potencijal) te kemijska (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost) svojstva. Također je, nakon završenog emulgiranja, praćeno trenutno stanje kapljica pripremljenih emulzija čiji je promjer izražen kao prosječni Feretov promjer. Primjenom metode odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) određeni su optimalni uvjeti procesa emulgiranja, s obzirom na određena kemijska svojstva pripremljenih emulzija.

Nadalje, provedena je *in vitro* simulacija probavnog sustava kako bi se odredila i usporedila biodostupnost polifenolnih spojeva iz vodenih ekstrakata ružmarina i origana i njihovih emulzija, pripremljenih pri optimalnim uvjetima procesa emulgiranja. Nakon završene *in vitro* probave, uzorcima su izmjerena fizikalna (ukupne otopljene tvari, vodljivost) te kemijska

(ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost) svojstva te su dobiveni rezultati analizirani i uspoređeni kako bi se istražila učinkovitost procesa emulgiranja te u kojem je obliku najbolje konzumirati navedene biljke za očuvanje ljudskog zdravlja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PORODICA BILJAKA USNAČA (*Lamiaceae*)

Biljke iz porodice usnača (*Lamiaceae*) komercijalno su važne biljke koje se sastoje od 250 rodova i 7825 vrsta. Neki od najvećih i najpoznatijih rodova su *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Vitex*, *Tymus* i dr. Mnoge vrste su visoko aromatične i sadrže složenu mješavinu bioaktivnih sekundarnih metabolita koji doprinose njihovoj važnosti i upotrebi kao medicinske i začinske biljke (Rattray i Van Wyk, 2021). Članovi ove porodice biljaka imaju važnu ulogu u kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim industrijama. Zbog tako široke primjene, biljke iz ove porodice široko se uzgajaju te one služe kao izvori funkcionalne hrane (Chakrabartty i sur., 2022). Visoki udio sekundarnih metabolita koji pokazuju antioksidacijsko, antimikrobno i antitumorsko djelovanje odgovorni su za njihovu biološku učinkovitost pa biljke iz ove porodice imaju važnu ulogu u liječenju mnogih stanja kao što su primjerice kardiovaskularne bolesti (Chakrabartty i sur., 2022).

2.1.1. Ružmarin

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je aromatična biljka koja pripada porodici *Lamiaceae* (Rafael de Oliveira i sur., 2019). Zimzelena je biljka s tamnozelenim, kratkim listovima koja cvate dva puta godišnje i naraste do visine od tri metra (Carrubba i sur., 2020). Vrlo je poznata, medicinski vrijedna biljka koja se koristi u obliku suhe biljke ili u obliku eteričnog ulja zbog svog poželjnog okusa (Tavassoli i sur., 2011), ali i visokog sadržaja bioaktivnih komponenata s različitim farmakološkim djelovanjem, posebno antimikrobnim, antitrombičnim, diuretičkim, antiupalnim, antioksidacijskim, hepatoprotektivnim, antikancerogenim i antidijabetičkim djelovanjem te preveniranjem pretilosti (Fernandez-Ochoa i sur., 2017). Učinci koje pokazuje ova biljka uključuju: prevenciju astme, ateroskleroze, katarakte, hepatotoksičnosti, upalnih bolesti te ishemične bolesti srca. Zatim antioksidacijsko i antiupalno djelovanje, kontrolu hiperkolesterolemije i oksidativnog stresa, smanjenje krvnog tlaka, smanjenje lipidne peroksidacije, antivirusno i antimikrobno djelovanje, smanjenje glikemije, relaksiranje mišića i liječenje kožnih alergija te sposobnost liječenja depresivnog ponašanja (Rafael de Oliveira i sur., 2019).

2.1.1.1. Kemijski sastav ružmarina

Kemijski sastav ružmarina vrlo je složen, a fitokemijske studije pokazuju kako su glavna obitelj

kemijskih sastojaka ružmarina fenolkarboksilne kiseline od kojih najviše ružmarinska kiselina, a zatim kafeinska, kininska i vanilična kiselina (Gird i sur., 2017).

Između prirodnih antioksidansa, ružmarin je široko prihvaćen kao jedan od vrsta s najvećom antioksidacijskom aktivnošću. Dosadašnja istraživanja pokazuju da su najaktivnije komponente fenolni diterpeni poput karnosola, rosmnola, 7-metil-epi-rosmnola, isorosmanola, karnozinske kiseline i drugih fenolnih kiselina poput ružmarinske i kafeinske (Ibanez i sur., 2003). Brojna *in vitro* istraživanja provedena su s ciljem utvrđivanja pozitivnih učinaka ružmarinske kiseline, a neki od potvrđenih uključuju antioksidacijsko, antibakterijsko i antivirusno djelovanje, antiupalno, hepatoprotektivno, antikancerogeno i imunomodulatorno djelovanje i mnoge druge. Pretklinička istraživanja pokazuju pozitivan učinak u liječenju osteoartritisa, poboljšanje kognitivnih sposobnosti i raspoloženja kod starijih osoba te antistresno djelovanje. Pokazalo se i da pomaže u liječenju edema, lokalnog svrbeža i da može moderirati atopijski dermatitis, a neka istraživanja sugeriraju i potencijalnu ulogu ružmarinske kiseline kao koterapeutika u liječenju metaboličkog sindroma (Hilt i sur., 2020).

Također, pokazalo se da prevenira Alzheimerovu bolest i inducira apoptozu stanica kolorektalnog karcinoma što je povezano uz njezinu snažnu antioksidacijsku aktivnost (Dinnies Santos i sur., 2012).

Osim ružmarinske kiseline, druga važna skupina kemijskih spojeva su diterpeni, od kojih su najzastupljenije karnozinska kiselina i karnosol. Od ostalih komponenti, ružmarin sadrži još i flavone (galokatehin, hesperidin), zatim triterpene (urosolna, betulinska i mikromerna kiselina) te esencijalna ulja koja se značajno razlikuju u kemijskom sastavu ovisno o vegetacijskom stanju, botaničkoj vrsti i okolišnim uvjetima (Gird i sur., 2017).

2.1.2. Origano

Origano (*Origanum vulgare* L.) je višegodišnja zeljasta biljka s područja Mediterana koja pripada porodici Lamiaceae i poznata je još od doba antike. Aromatična je biljka visine 20-80 cm s blijedoružičastim cvjetovima skupljenim u razgranatom cvatu. Sadrži nekoliko uspravnih stabljika, cvjetove koji su vertikalno raspoređeni u guste ili rahle klasove te peteljkaste listove (Bhatt i sur., 2020).

Važna je biljka zbog svog antibakterijskog, antifungalnog, antivirusnog i antioksidacijskog djelovanja koji su posljedica složenog kemijskog sastava (Gonceariuc i sur., 2021). Zbog visoke antioksidacijske aktivnosti ima ulogu prirodnog konzervansa u hrani i kozmetici (Oniga i sur., 2018).

Origano se tradicionalno koristio u narodnoj medicini za ublažavanje stanja kao što su astma, bronhitis, kašalj, dijareja, probavne smetnje, bolovi u trbuhu, menstrualni poremećaji, infekcije, bolesti povezane s upalom i dijabetes. Pozitivan učinak origana na zdravlje ljudi pripisuje se sadržaju fitokemikalija (Guttriérrez-Grijalva i sur., 2018).

2.1.2.1. Kemijski sastav origana

Najvažniji kemijski sastojci origana su esencijalna ulja, polifenoli (flavonoidi i fenolne kiseline), triterpenoidi i steroli (Oniga i sur., 2018).

Glavne komponente esencijalnog ulja origana su timol i karvakrol, ali i druge komponente poput fama terpiena, beta mikrena i alfa terpiena (Fernandez-Ochoa i sur., 2017).

Glavne polifenolne komponente u origanu su flavonoidi i fenolne kiseline. Oni su istraživani zbog svojeg terapijskog potencijala koji se uglavnom pripisuje njihovim antioksidacijskim karakteristikama. Najzastupljeniji flavonoidi u origanu su flavoni su dok su hidroksicimetne kiseline dio neflavonoidnih fenola i glavne su podskupine fenolnih kiselina raspoređenih u različitim vrstama origana (Guttriérrez-Grijalvai sur., 2017).

2.2. ANTIOKSIDANSI

Bioaktivne komponente hrane biljnog podrijetla vrlo su važne sastavnice ljudske prehrane i iako se ne klasificiraju kao esencijalni nutrijenti, imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Za razliku od vitamina, njihov nedostatan unos neće rezultirati specifičnim simptomima ili deficitom, ali će povećati rizik razvoja kroničnih bolesti. Bioaktivne komponente hrane biljnog podrijetla uključuju: terpenoide, fenolne komponente (uključujući polifenole), glukozinolate i dr. (Ruskovska i sur., 2020).

Antioksidansi su tvari koje kada su prisutne u niskoj koncentraciji značajno usporavaju oksidaciju supstrata i utječu na tzv. hvatanje slobodnih radikala (Shahidi i Zhong., 2010). Najčešći slobodni radikali u ljudskom organizmu su reaktivne kisikove vrste poput hidroksilnih radikala (Ruskovska i sur., 2020). Prepoznato je da reaktivne kisikove vrste koje generiraju mitohondriji, fagociti, peroksisomi i enzimi citokroma P450 mogu uzrokovati oštećenja na molekuli DNA, proteinima i lipidima te uzrokovati pojavu oksidativnog stresa (Gordon, 2012). Do sada je objavljeno mnoštvo istraživanja koji potvrđuju poveznicu između oksidativnog stresa i različitih bolesti kod ljudi te je danas gotovo nemoguće pronaći bolest ili stanje koje nije povezano s oksidativnim stresom (Ruskovska i sur., 2020).

Najveću skupinu antioksidansa predstavljaju polifenoli te su oni široko istraživani zbog njihove

kemijske strukture, prehrambenih izvora, antioksidacijske aktivnosti i učinka na zdravlje (Shahidi i Zhong, 2010). Neki od dokazanih pozitivnih učinaka su preventivno djelovanje polifenola na kardiometaboličke bolesti poput dijabetesa tipa 2 ili ateroskleroze, a također postoje dokazi da ekstrakti polifenola pozitivno utječu na neurodegenerativne bolesti i neke vrste tumora (Ruskovska i sur., 2020). Uz to, dokazan je učinak fenolne kiseline na ekspresiju gena za antioksidativne enzime te se pokazalo kako flavonoidi djeluju na staničnu signalizaciju i ekspresiju gena (Gordon, 2020).

Osim pozitivnog učinka na zdravlje, antioksidansi imaju i pozitivan učinak na proizvodnju prehrambenih proizvoda jer preveniraju oksidaciju lipida koja se može dogoditi tijekom bilo koje faze proizvodnje hrane te dovesti do razvoja neugodnog okusa, gubitka esencijalnih masnih kiselina, vitamina topljivih u mastima i drugih biokativnih komponenti te do formiranja potencijalno toksičnih komponenti. Najučinkovitija, najpogodnija i ekonomski najisplativija strategija u borbi protiv lipidne oksidacije je dodatak antioksidansa te se diljem svijeta koristi za stabilizaciju lipida u hrani, preveniranje pogoršavanja kvalitete hrane i produživanje roka trajnosti proizvoda (Shahidi i Zhong, 2010).

2.2.1. Polifenolni spojevi

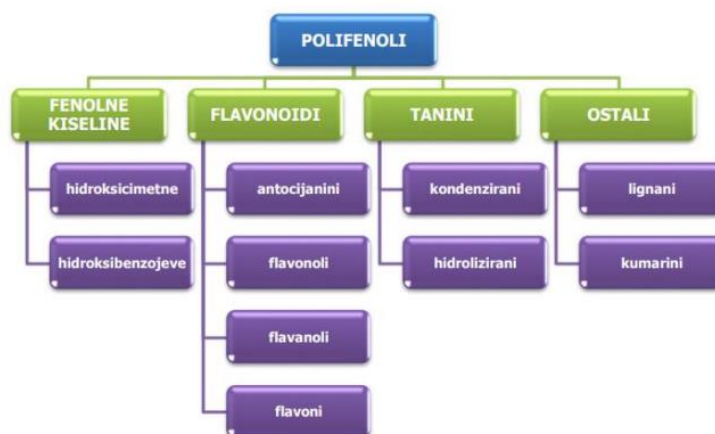
Polifenoli su bioaktivne tvari iz hrane biljnog podrijetla koji pripadaju skupini antioksidansa te ulaze u interakcije sa slobodnim radikalima i nestaju tijekom reakcije (Dinnies Santos i sur., 2012). Oni imaju mogućnost neutralizirati lipidne peroksidne radikale i kao takvi važan su dio teorije oksidativnog stresa. Prisutni su u relativno visokim koncentracijama u ljudskoj prehrani, a nalaze se uglavnom u voću (bobičastom i jabukama), povrću (luk, špinat, brokula, šparoge), začинима (crni papar, kurkuma, šafran), cjelovitim žitaricama, kavi, kakau, čaju, maslinama i različitim vrstama biljnih ulja. Mnogi od njih se koriste i kao prehrambeni suplementi ili kao biljni lijekovi (Ruskovska i sur., 2020).

Brojne studije istaknule su kako je većina bioloških aktivnosti biljaka povezana s fenolnim komponentama te je u zadnjih nekoliko godina, nekoliko istraživanja pokazalo antiproliferativnu aktivnost polifenola ružmarina u različitim modelima tumorskih stanica kao što su stanice karcinoma prostate, neuroblastoma, kolorektalnog karcinoma ili karcinoma jajnika (Fernandez-Ochoa i sur., 2017).

Osnovna struktura polifenola je aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina sa širokim rasponom polimerizacije. Rangiraju se od jednostavnih molekula poput fenolnih kiselina do visoko polimeriziranih komponenti poput tanina (Bravo, 1998) i njihova

je osnovna podjela prikazana na slici 1.

Primarno dolaze u konjugiranoj formi s jednom ili više šećernih jedinica vezanih na hidroksilnu grupu, iako postoji i direktno vezanje šećernih jedinica na aromatski ugljikov atom. Vezani šećeri mogu biti prisutni kao monosaharidi, disaharidi ili čak oligosaharidi, a najčešće je vezana glukoza (Gonzalez Bravo, 1998).



Slika 1. Podjela polifenola (Golubić, 2018)

2.2.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

U današnje vrijeme gotovo je nemoguće pronaći proizvodni proces u kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj ili kemijskoj industriji koji ne koristi ekstrakcijske procese poput maceracije, vodene destilacije ili destilacije vodenom parom, a sama ekstrakcija definira se kao proces prijenosa tvari iz krute ili tekuće faze u neko otapalo koje se s tom fazom ne miješa (Chemat i sur., 2012). Desetljećima se u laboratorijima koriste tzv. komercijalne metode ekstrakcije kao što su maceracija, infuzija ili obični refluks (Yousif Mutalib, 2014). Međutim nedostatak ovih metoda je veliki utrošak vremena i otapala zbog čega najnoviji trendovi u ekstrakcijskim tehnikama imaju fokus na pronalasku otopina koje minimiziraju korištenje otapala dok istovremeno omogućuju intenziviranje procesa i isplativiju proizvodnju visokokvalitetnih ekstrakta (Chemat i sur., 2012). Neki od primjera ekstrakcija koji zahtijevaju manji utrošak vremena i otapala su ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Yousif Mutalib, 2014).

Za ekstrakciju antioksidansa iz aromatičnih biljaka koriste se različite metode poput ekstrakcije čvrsto-tekuće, ekstrakcije vodom kao otapalom i ekstrakcije superkritičnim fluidom (Ibanez i

sur., 2003). Fenolni spojevi mogu biti ekstrahirani iz svježih, smrznutih ili sušenih biljnih sastojaka i najčešće se ekstrahiraju različitim otapalima poput etanola, metanola ili etil acetata s različitim omjerima vode. S obzirom da biljni materijal može sadržavati jednostavne (fenolne kiseline) ili visoko polimerizirane fenole (npr. tanine) te da oni mogu biti povezani s drugim komponentama biljke poput ugljikohidrata i proteina ne postoji univerzalni postupak ekstrakcije prikladan za ekstrakcije svih biljnih fenola (Dai i Mumper, 2012).

Kod odabira ekstrakcijske metode važno je odabrati pravo otapalo s obzirom na to da ono utječe na količinu i stupanj ekstrahiranih polifenola, ali također i definirati vrijeme ekstrakcije i temperaturu koji utječu na izdvajanje fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Povećanje temperature ekstrakcije povećava topljivost analita, a smanjuju se viskoznost i površinska napetost otapala što poboljšava brzinu ekstrakcije. Međutim s obzirom da duže vrijeme ekstrakcije i visoka temperatura povećavaju oksidaciju fenola što smanjuje njihov prinos važno je pronaći optimalno vrijeme i temperaturu (Dai i Mumper, 2012).

2.3. EMULZIJE

Emulzije su disperzni sustavi, termodinamički nestabilni koji pod djelovanjem vanjskih sila ili poremećaja imaju tendenciju razdvajanja. Kako bi se kontroliralo emulgiranje i stabilnost emulzija koriste se odgovarajuće komponente kao što su tenzidi niske mase, biomolekule, polimeri, proteini, čvrste nanočestice ili složenije asocijacije tenzida i nanočestica. Budući da su ove komponente općenito amfifilne, adsorbiraju se na međupovršini faza voda-ulje mijenjajući svoja svojstva (Ravera i sur., 2020).

Emulzije se uobičajeno koriste u prehrambenoj industriji za stvaranje širokog spektra emulgiranih prehrambenih proizvoda poput pića, mlijeka, umaka, deserta, preljeva, majoneze, margarina i maslaca. Priroda emulzije daje ovoj hrani različite funkcionalne značajke poput željenog izgleda, teksture, osjećaja u ustima i okusa (Radić, 2020).

2.3.1. Vrste emulzija

Emulzije su disperzni sustavi dvije nemješivih faza u obliku kapljica čiji je promjer 0,1 – 100 µm. Između dviju faza je međupovršinski sloj na koji se mogu vezati neke površinski aktivne tvari (Singh i sur., 2009).

Emulzije se mogu podijeliti na ulje u vodi (engl. *oil in water*; O/W) ili voda u ulju (engl. *water in oil*; W/O) emulzije ovisno je li dispergirana faza ulje ili voda. Također postoji nekoliko tipova višestrukih emulzija poput voda u ulju u vodi (engl. *water in oil in water*; W/O/W). Emulzijama

se dodaju emulgatori kako bi ih stabilizirali i zadržali kinetičku stabilnost sustava (Niknam i sur., 2020).

Postoji mnogo proizvoda u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji koji sadrže tip emulzije voda u ulju. Mehanizam stabilizacije ovih emulzija razlikuje se od emulzija tipa ulja u vodi koji mogu biti stabilizirane i steričkim i elektrostatskim odbijanjem. U slučaju emulzija tipa voda u ulju (W/O) samo steričke sile stabiliziraju emulzije zbog niske električne vodljivosti kontinuirane faze. Emulgatori za pripremu emulzija voda u ulju imaju nisku HLB (engl. *hydrophilic – lipophilic balance*) vrijednost odn. niski odnos hidrofilne i lipofilne grupe (Ushikubo i Cuncha, 2012).

Emulzije ulje u vodi (O/W) disperzije su ulja u vodi u formi malih kapljica stabilizirani s jednim ili više surfaktanata, tj. emulgatora. Surfaktanti su površinski aktivne tvari koje smanjuju površinsku napetost između uljne i vodene faze što je nužno za dugotrajnu stabilnost dispergiranih uljnih kapljica (Haensler, 2016). Formiranje, stabilnost i karakteristike emulzija ovise o karakteristikama (polarnost, topljivost u vodi, viskoznost, gustoća, itd.) uljne faze i vrsti te koncentraciji komponenti prisutnih u vodenoj fazi. Izbor surfaktanta korištenog kao emulgatora je jako važan za prehrambenu industriju jer ne samo da mora stvarati i stabilizirati kapljice dispergirane faze nego mora biti i biorazgradiv i netoksičan (Niknam i sur., 2020).

Voda u ulju u vodi (W/O/W) dvostruka je emulzija formirana s malim kapljicama vode u velikim kapljicama ulja dispergiranim u tekućoj kontinuiranoj fazi. Predstavljaju bolji inkapsulacijski sustav za hidrofilne polifenole od emulzija ulje u vodi jer otpuštanje polifenola može biti prolongirano i bolje kontrolirano. Ipak i emulzije ulje u vodi i voda u ulju u vodi su visoko osjetljive na nestabilnost. Smanjenje veličine kapljica uvelike poboljšava stabilnost i rok trajanja emulzija, ali vrlo mala veličina čestica i stoga vrlo velika specifična površina kapljica u nanoemulzijama može pospješiti kemijsku razgradnju inkapsuliranih spojeva (Niknam i sur., 2020).

Emulzije se mogu podijeliti i prema veličini čestica na mikro i nanoemulzije. Nanoemulzije su emulzije čija je veličina čestica u rasponu 20 – 500 nm. Mala veličina čestica omogućuje im visoku stabilnost i otpornost prema taloženju što je vrlo poželjno u kozmetičkoj, agrokemijskoj i farmaceutskoj industriji (Ren i sur., 2019). Mikroemulzije su disperzije koje se sastoje od vode, ulja i surfaktanta, izotropan su i termodinamički stabilan sustav s veličinom čestica 1 – 100 nm, obično 10 – 50 nm (Jurkin i Gotik, 2013).

2.3.2. Mehanizam stvaranja emulzija

Proces emulgiranja sastoji se u fragmentaciji jedne tekuće faze unutar druge uz stvaranje velikog broja malih kapljica. Emulzije u industrijskom ili istraživačkom polju proizvode se korištenjem različitih mehaničkih uređaja poput miksera, visokotlačnih ventila ili membrana, homogenizatora, mikrofluidizatora i sonikatora. Izbor metode ovisi o polju primjene kao i o vrsti upotrebljenog emulgatora. Osnovni principi o ulozi adsorpcijskih svojstava emulgatora i dinamičkih procesa koji se odvijaju tijekom stvaranja emulzija zajednički su većini sustava i tehnika. U svim slučajevima, učinkoviti emulgatori imaju snažnu sposobnost snižavanja površinske napetosti, kratko karakteristično vrijeme adsorpcije i visoki stupanj pokrivenosti međupovršine voda-ulje nakon adsorpcije što ima ulogu u određivanju prosječne veličine kapljica, raspodjelu veličine i posljedično njihovu stabilnost (Niknam i sur., 2020).

Priprema emulzija uvijek uključuje korištenje primarne homogenizacije (izravna priprema iz dvije odvojene tekućine) i/ili sekundarnu homogenizaciju (smanjenje veličine kapljica u postojećim emulzijama). Kontrola uvjeta homogenizacije (temperatura, tlak i ciklusi) je potrebna za dobivanje emulzija sa željenim svojstvima (veličina čestica, stabilnost i inkapsulacija i isporuka bioaktivnih komponenti) (Niknam i sur., 2020).

2.3.3. Zeta potencijal

Objašnjenje fenomena povezanog s površinskim nabojem krute faze u dodiru s tekućom omogućila je teorija dvostrukog električnog sloja. Prema ovoj teoriji, elektrokinetički ili zeta potencijal je mjerljivo svojstvo elektriziranog sučelja. Ako je elektrizirano sučelje između dviju faza pod utjecajem vanjskog električnog polja koje djeluje paralelno s površinom sučelja, dolazi do relativnog kretanja jedne faze prema drugoj. Potencijal klizne ravnine koji se može eksperimentalno mjeriti je elektrokinetički ili zeta potencijal. On se mijenja ovisno o promjenama u otopini što znači da je mjerenjem zeta potencijala moguće pratiti promjene koje se događaju u otopinama zbog čega je njegovo mjerenje važni kontrolni postupak u mnogim tehnološkim procesima (Salopek i sur., 1992).

Zeta potencijal u koloidnim disperzijama i emulzijama određuje se mjerenjem elektroforetske pokretljivosti ili elektroakustičnih efekata u prvom redu radi ocjene stabilnosti takvih koloidnih sustava (Luxbacher i sur., 2019).

Kao opća granica između stabilnog i nestabilnog koloidnog sustava uzima se +30 ili – 30 mV. Čestice sa zeta potencijalom 30 mV i više, odnosno – 30 mV i niže smatraju se stabilnima. Ukoliko je zeta potencijal od 0 do 5 mV čestica koloida se približava neutralnom stanju ili je

neutralna što znači da koloidne čestice teže koaguliranju ili destabiliziranju (Salopek i sur., 1992).

2.4. MEHANIZAM PROBAVE U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU

Gastrointestinalni trakt definira se kao cijev čija je dužina 8 do 9 m te se proteže od usta do anusa i sastoji se od ždrijela, jednjaka, želuca, tankog i debelog crijeva. Uz to, uključuje i dodatne organe kao što su zubi, jezik, žlijezde slinovnice, jetra, žučni mjehur i gušterača (Sensoy, 2021). Ima specifične funkcije, a anatomija i fiziologija vrlo su složene zbog mnoštva stanica koje ga izgrađuju te integracije neuroloških, imunoloških, sekrecijskih i apsorpcijskih signala i signala pokretljivosti. Osim što sadrži različite specijalizirane stanice, funkcija gastrointestinalnog trakta pod utjecajem je prisutnog intestinalnog mikrobioma, kroničnog stresa, upale i živčane regulacije putem mozak-crijevo osi (Collier i sur., 2022).

Gastrointestinalni sustav mora fizički i kemijski razgraditi unesenu hranu na njezine komponente koje se onda dalje metaboliziraju i iskorištavaju u organizmu (Sensoy, 2021). Hrana se fizički razlaže na manje dijelove u ustima i u želucu dok se u tankom crijevu događa glavna apsorpcija nutrijenata (Kong i Singh, 2008).

Središnje mjesto u fiziologiji probavnog sustava zauzima mehanizam peristaltike. Peristaltika je gastrointestinalni motorički obrazac koji uključuje djelomičnu okluziju lumena koji pomiče sadržaj prema analnom smjeru (Huizinga i Lammers, 2009).

2.4.1. Probava u ustima

Hrana ulazi u probavni sustav kroz usta gdje se žvakanjem smanjuje veličina njezinih čestica (Sensoy, 2021). U ustima se izlučuje slina koja sadrži natrijeve, kalcijeve i kalijeve ione, mucin i enzim alfa amilazu te se miješanjem sa slinom hrana podmazuje i hidratizira (Kong i Singh, 2008). Alfa amilaza razgrađuje molekule škroba tako što kida alfa 1,4 glikozidne veze iz škroba čime nastaju disaharid maltoza i trisaharid maltotrioza (Berg i sur., 2013).

U ustima se formira bolus hrane koji se zatim transportira kroz jednjak do želuca mehanizmom peristaltike (Kong i Singh, 2008). Napredujuća faringealna kontrakcija potiskuje bolus kroz gornji ezofagealni sfinkter u jednjak (Diamant, 1997).

Formiranje bolusa uključuje deformaciju i propadanje hrane koji se ostvaraju koordiniranim djelovanjem zubiju, jezika i mehanizma lučenja sline (Sensoy, 2021).

2.4.2. Probava u želucu

Zatvaranjem gornjeg ezofagealnog sfinktera, započinje procesivna kružna kontrakcija u gornjem dijelu jednjaka. Ona se zatim nastavlja distalno duž poprečno-prugastih i glatkih mišića jednjaka i pomiče bolus kroz donji ezofagealni sfinkter u želudac (Diamant, 1997).

U želucu se bolus iz ustiju miješa s probavnim enzimima i dolazi do probave koja uključuje različite fizičke i kemijske procese. Fizički procesi poput kontrakcije utječu na veličinu čestica hrane dok kemijski procesi kao što je sekrecija kiselina i probavnih enzima imaju utjecaj na omekšavanje hrane i hidrolizu nutrijenata. Osim toga, kiseli okoliš koji prevladava u želucu, aktivira izlučivanje pepsina i uzrokuje denaturaciju nutrijenata (Sensoy, 2021).

Želudac se sastoji od četiri dijela: fundusa, tijela, antruma i pilorusa te ima tri glavne funkcije, a to su pohrana i miješanje hrane te pražnjenje želučanog sadržaja (Kong i Singh, 2008).

Peristaltički valovi kreću od stijenke želuca i šire se prema antrumu čime dodatno miješaju i tjeraju želučani sadržaj prema pilorusu koji se kontrahira kako bi usporio pražnjenje želuca što rezultira daljnjim miješanjem želučanog sadržaja. Za to vrijeme, želudac transformira svoj sadržaj u himus koji je kombinacija razdvojenih faza vodene otopine, masti i čvrste tvari. Intenzivniji peristaltički valovi potiču antralno pražnjenje što omogućuje želučanom sadržaju da prođe kroz pilorus i uđe u duodenum (Kong i Singh, 2008).

Sfinkteri koji povezuju želudac s jednjakom i duodenumom su pod kontrolom živčanog sustava i odgovorni su za prolazak himusa preko ritmične relaksacije prstena glatkog mišića čime dopuštaju dijelu probavljene hrane da prođe do duodenuma. Himus ide dalje prema tankom crijevu u malim količinama i reguliranim intervalima (Sensoy, 2021).

2.4.3. Probava u tankom crijevu

Posljednja faza probave i apsorpcija većine nutrijenata događa se u tankom crijevu gdje se hrana otapa uz sokove iz gušterače, jetre i crijeva. Svi probavljeni nutrijenti apsorbiraju se kroz stijenke crijeva, a otpadni produkti se potiskuju u debelo crijevo radi izlučivanja (Kong i Singh, 2008).

Tanko crijevo je sa želucem povezano preko pilorusa i s kolonom preko ileocekalnog zalistka. Glavni dijelovi tankog crijeva su duodenum, jejunum i ileum (Sensoy, 2021).

U duodenum se izlučuju sokovi gušterače i otvara se žučni mjehur. Kad himus dođe u duodenum, stimulira gušteraču na otpuštanje koncentrirane otopine bikarbonata koja neutralizira kiseli sok želuca. Sekret gušterače uključuje mnoge enzime kao što su proteaze (tripsin i kimotripsin), pankreatična lipaza i pankreatična amilaza. Osim sekreta gušterače u

duodenum se izlučuje i žuč koja se sastoji od žučnih soli, fosfolipida, kolesterola, bilirubina, elektrolita i vode te olakšava probavu i apsorpciju lipida, djelujući kao emulgator (Sensoy, 2021).

U tankom crijevu probavni enzimi razgrađuju proteine, ugljikohidrate, trigliceride i nukleinske kiseline na manje molekule koje se konačno razgrađuju na površini četkaste membrane koja se sastoji od mikrolesica koji izlučuju enzime koji hidroliziraju disaharide, peptide i nukleotide do njihovih osnovnih jedinica za apsorpciju poput monosaharida i aminokiselina. Ti se monomeri zatim apsorbiraju preko crijevnog zida i transportiraju se u krvotok. Glavnina apsorpcija događa se u proksimalnom dijelu tankog crijeva, odnosno u ileumu. Brzina apsorpcije vode i nutrijenata je različita u jejunumu i ileumu jer su resice u proksimalnoj regiji velike i veća je površina za apsorpciju (Sensoy, 2021).

2.4.4. Probava u debelom crijevu

U debelom crijevu završava proces probave. Debelo je crijevo povezano s tankim preko ileocekalnog zalistka koji štiti otvor ileuma u cekum. U debelom crijevu dolazi do apsorpcije vode dok se preostali gusti otpad izbacuje čime završava probava.

Svaki dan oko 1,5 – 2 L himusa prođe kroz ileocekalni zalistak. Volumen himusa postane oko 150 mL nakon što se voda apsorbira u kolonu. U debelom crijevu vlada anaerobni okoliš i koloniziran je sa zajednicom mikroorganizama kojeg tvore uglavnom anaerobne bakterije. Mikrobiota proizvodi različite enzime koji razgrađuju dijetalna vlakna koja nisu probavljena u tankom crijevu. Bakterije također metaboliziraju žučne soli i pankreatin koji dolaze u kolon koji također sadrži bakterije koje sintetiziraju neke esencijalne vitamine (niacin, B1 i vitamin K). Kontrakcije u debelom crijevu miješaju himus i guraju sadržaj prema stijenkama (Sensoy, 2021).

2.4.5. *In vitro* probava

U posljednje vrijeme, povećan je interes za modificiranje matriksa i strukturalnih karakteristika hrane kako bi se optimirala njezina probava, ali i apsorpcija što bi imalo pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Kako bi se to ostvarilo potrebno je mnogo istraživanja probave hrane u probavnom traktu što predstavlja određeni problem s obzirom da je istraživanje probave kod ljudi složen i skup proces koji značajno varira od osobe do osobe. Osim toga, ograničeno je i etičkim razlozima, a životinjske modele kao alternativu potrebno je izbjegavati koliko god je to moguće. Upravo zbog tih ograničenja, istraživači su razvili mnoge *in vitro* modele koji

simuliraju ljudski probavni trakt za istraživanja (Sensoy, 2021). *In vitro* metode probave etički su superiornije, jeftinije i brže od *in vivo* metoda te predstavljaju sigurnu alternativu životinjskim i ljudskim modelima. Idealni *in vitro* model trebao bi osigurati precizne rezultate u kratkom vremenu te se može koristiti kao učinkovit alat za istraživanje probavljivosti ili biodostupnosti različite hrane (Lee i sur., 2016.)

Gastrointestinalni simulacijski modeli generalno uključuju probavu hrane u ustima, želucu i tankom crijevu te nastoje prikazati fiziološke uvjete u probavnom sustavu tako što uzimaju u obzir prisutnost određenih probavnih enzima kao i njihovu koncentraciju, zatim pH, temperaturu, odgovarajuće soli koje sudjeluju u probavi te vrijeme potrebno za razgradnju hrane (Jurinjak-Tušek i sur., 2020).

2.4.6. Probava polifenolnih spojeva

Prehrambeni polifenoli prisutni su uglavnom u glikoziliranoj formi s jednim ili više šećera konjugiranih na hidroksilnu grupu aromatskog prstena što je razlog niske apsorpcije u želucu s obzirom da se samo aglikoni i neki glukozidi mogu apsorbirati u tankom crijevu dok se ostatak apsorbira u kolonu. Glikozidi u polifenolima iz hrane omogućuju bržu i učinkovitiju apsorpciju polifenola. Izoflavoni se apsorbiraju najbolje zajedno s galnom kiselinom, sljedeći su katehini, flavanoni i kvercetin glikozidi. S druge strane, proantocijani, katehini čaja i antocijani se najmanje apsorbiraju. Općenito se polifenoli apsorbiraju pasivnom difuzijom (Brglez Mojzer i sur., 2016).

2.4.7. Probava emulgiranih vodenih ekstrakata

U današnje vrijeme sve se više pažnje posvećuje polifenolima u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog potencijalne uloge u prevenciji različitih bolesti. Međutim, različiti faktori poput okolišnih uvjeta, procesiranja i skladištenja hrane te uvjeti u probavnom sustavu kao što su pH, prisutnost enzima i drugih nutrijenata utječu na smanjenje koncentracije polifenola i uzrokuju smanjenje ili potpuni gubitak bioaktivnosti polifenola (Pimentel – Moral i sur., 2018). Osim toga, velik broj polifenolnih spojeva iz prirodnih izvora imaju ograničenu topljivost u vodi te neugodan okus (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

Iz navedenih razloga, primjena fenolnih spojeva zahtijeva zaštitnu formulaciju koja održava integritet polifenola do konzumacije, maskira njegov okus, povećava topljivost u vodi te njegovu bioraspoloživost. Bioraspoloživost označava količinu unesenog nutrijenta koja dopijeva u sistemsku cirkulaciju te mjesta na kojima može izvršiti svoje biološko djelovanje.

Drugim riječima, označava kolika količina unesenih polifenola može imati pozitivan učinak u ciljanim tkivima (Archivio i sur., 2010).

Jedna od metoda koja omogućuje navedeno je inkapsulacija (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Kako bi se polifenoli mogli inkapsulirati, razvijen je širok raspon tehnologija poput sušenja raspršivanjem, micela, liposoma, nanočestica, sušenje smržavanjem ili stvaranje emulzija. Emulzije se smatraju najpopularnijim inkapsulacijskim sistemom zbog visoke učinkovitosti inkapsulacije, održavanja kemijske stabilnosti inkapsuliranih molekula i kontroliranog otpuštanja molekula, a neki emulzijom inkapsulirani polifenoli pokazuju čak veću biološku aktivnost u usporedbi sa čistim molekulama polifenola (Lu i sur., 2016).

Fenolne komponente izrazito su reaktivne molekule i prolaskom kroz gastrointestinalni trakt mogu reagirati s produktima lipidne peroksidacije što može uzrokovati oštećenja koja će dovesti do smanjenja polifenolne aktivnosti. Ovakva interakcija izbjegava se inkapsulacijom s nano ili mikročesticama što ima pozitivan učinak na biodostupnost i aktivnost polifenola u nižim dijelovima gastrointestinalnog trakta (Pimentel – Moral i sur., 2018). Mikročestice imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, proizvodnji nutriceutika te u polju prehrambenog inženjerstva s obzirom da mikroinkapsulacija omogućuje veću učinkovitost, nižu toksičnost i povećanu stabilnost proizvoda u odnosu na konvencionalne formulacije. Također, one omogućuju duži vijek trajanja proizvoda, maskiraju loš okus te kontroliraju oslobađanje molekula na pravom mjestu i u pravo vrijeme (Dalmoro i sur., 2017).

Prednosti nanoemulzija su njihova veća površina što dovodi do veće apsorpcije, poboljšanja njihove fizičke stabilnosti i bioraspoloživosti. One također omogućuju brže otpuštanje inkapsuliranih spojeva te brzu probavu zbog male veličine kapljica i velike površine. Takve male čestice se onda mogu apsorbirati limfnim žilama ili endocitozom kroz mukozni sloj prisutan u crijevima (Pimentel – Moral i sur., 2018).

2.5. PROTEINI GRAŠKA KAO EMULGATORI

Jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina iz hrane je emulgiranje, koje im omogućuju njihova amfoterna svojstva, čime smanjuju međupovršinsku napetost i stabiliziraju fazu ulje/voda. Proteini koji se trenutno najviše koriste u prehrambenoj industriji većinski se dobivaju iz mlijeka, soje, jaja i sl. (Burger i Zhang, 2009). Međutim, posljednjih godina raste interes za pronalazak drugih proteina koji bi se koristili kao emulgatori u prehrambenoj industriji ponajviše zbog ekonomskih zahtjeva za održivim sustavom proizvodnje hrane, ali i zbog alergnog potencijala navedenih proteina. Iz tog je razloga posljednjih nekoliko godina

porastao interes za proteinima graška kao alternativa sojinim proteinima zbog njihovog povoljnog profila aminokiselina, niskog alergenog potencijala i visoke dostupnosti (Kutzli i sur., 2020). Uz to, povećan interes za proteinima graška povezan je i s rastućom veganskom populacijom, popularizacijom proizvoda biljnog podrijetla, ali i povećane svjesnosti potrošača o pozitivnim nutritivnim karakteristikama koje ima grašak i proizvodi bazirani na grašku. Iako su manje topljivi u vodi, studije pokazuju kako mogu biti korišteni kao emulgatori za inkapsulaciju i zaštitu lipofilnih komponenti (Francisco i sur., 2020).

Grašak (*Pisum sativum* L.) je jedna od najkonzumiranijih i najkultiviranijih leguminoza u svijetu zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti i visokog sadržaja lizina. Međutim, unatoč prednostima, primjena izolata proteina graška i dalje je ograničena u prehrambenoj industriji kako zbog manjka znanja o njegovim strukturalnim i funkcionalnim svojstvima tako i zbog velike razlike između laboratorijskih i komercijalno pripremljenih proteina graška (Burger i Zhang, 2009).

Grašak u svom sastavu ima oko 20-30% proteina od čega 65-80% globulina i 10-20% albumina. Albumini su topljivi u vodi i smatraju se metaboličkim i enzimskim proteinom dok su globulini topljivi u otopinama soli i ponašaju se kao skladišni proteini. Svojstva emulgiranja proteina graška ostvarena su preko njegove amfolitičke prirode. Adsorpcija proteina na međupovršinu obično se odvija u dvije faze. Prvo, proteini migriraju i pričvrste se za međufazu ulje/voda. Nakon što se proteinske molekule transportiraju i prihvate za površinu, hidrofobni dio na površini proteina potiče adsorpciju. Tijekom druge faze, događa se strukturalno preuređenje proteina tako da se molekule proteina mogu djelomično denaturirati i ponovno se rasporediti kako bi hidrofilni dijelovi bili okrenuti prema vodenoj fazi, dok su hidrofobni dijelovi u uljnoj fazi. Ovakva preraspodjela proteinskih molekula omogućuje im stvaranje viskoelastičnog filma na međufaznom sloju koji stabilizira disperziju kapljica ulja putem elektrostatskog odbijanja i steričkih prepreka (Burger i Zhang, 2019).

2.6. METODA ODZIVNIH POVRŠINA

Prehrambena industrija nastoji unaprijediti sustav proizvodnje i povećati učinkovitost procesa bez povećanja troškova i utrošenog vremena. Pronalazak uvjeta s najboljim ishodima za sustav glavni je razlog optimiranja koja se često koristi. Jedna od najpopularnijih multivarijabilnih statističkih tehnika koja se koristi u optimiranju prehrambenog procesa je metoda odzivnih površina (engl. *Response surface methodology*; RSM). RSM predstavlja skup statističkih i matematičkih metoda uspostavljenih na prilagodbi polinomnog modela podataka koji moraju

pokazati ponašanje skupa podataka s ciljem izrade statističkih predviđanja (Yolhem i Jafari, 2016).

Ovaj je pristup uspješan za optimiranje, dizajniranje, razvoj i napredak procesa gdje na ishode utječe nekoliko varijabli. Općenito govoreći, RSM je prikladan i široko korišten pristup za optimiranje procesa u prehrambenoj industriji, a razvijen je od strane Box-a i njegovih kolega 1950-tih. Glavna prednost mu je smanjivanje broja eksperimenata koji su potrebni za procjenu višestrukih parametara i njihovih interakcija i prikazuje učinak nezavisnih varijabli na zavisne (Yolhem i Jafari, 2016).

RSM je učinkovita tehnika koja se široko primjenjuje za optimiranje uvjeta procesa ekstrakcije temeljenih na antioksidacijskoj aktivnosti biljaka (Yang i Hong, 2018). Prije nego što se primjeni RSM metodologija potrebno je odabrati dizajn eksperimenta koji će definirati koji eksperimenti se trebaju provesti u eksperimentalnom području koje se proučava. Za tu svrhu postoji nekoliko eksperimentalnih matrica. Neki od primjera su Centralni kompozitni dizajn (engl. *Central Composite Design*, CCD), Box-Behnken i Doehlert dizajn (Yolhem i Jafari, 2016). Centralni kompozitni dizajn predstavili su Box i Wilson i on se sastoji od frakcijskog faktorskog dizajna, dodatnog dizajna gdje su eksperimentalne točke najčešće udaljene od središta te središnje točke (Bezzeri i sur., 2008). Doehlert dizajn opisuje kružnu domenu za dvije varijable, sferičnu za tri varijable te hipersferičnu za više od tri varijable, čime se naglašava ujednočenost proučavanih varijabli u eksperimentalnoj domeni. Prednost ovog dizajna je što zahtjeva samo nekoliko eksperimentalnih točaka za primjenu te ima visoku učinkovitost (Bezzeri i sur., 2008).

Box-Behnken dizajn eksperimenta zahtjeva barem tri varijable korištene na tri različite razine. Matrica dizajna uključuje formiranje uravnoteženog nepotpunog blok dizajna gdje su dva faktora uparena na faktorski način 2×2 , dok se treći faktor nalazi u središnjoj točki. Središnja točka dizajna je procijenjena razina varijable (na temelju prethodnog istraživanja) koji bi dao optimalni odgovor za određenu varijablu odgovora koja se mjeri. Zatim se formiraju tri uravnotežena nepotpuna bloka koja mogu generirati 12 jedinstvenih točaka dizajna nakon čega se u dizajn dodaje 13-ta točka. Ta se točka naziva središnja (centralna) točka i ona se replicira tri do pet puta kako bi odredila stupnjeve slobode modela. Stabilnost cijelog dizajna ovisi o stabilnosti središnjih točaka. Dizajn je sferičan jer su razine faktora ravnomjerno raspoređene oko središnje točke (De Leon i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za pripremu vodenih biljnih ekstrakata korišteni su osušeni dijelovi biljaka ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) proizvođača Nutrigold (Zagreb, Hrvatska), berba 2021. godine te origana (*Origanum vulgare* L.) proizvođača Sonnentor (Sprögnitz, Austrija), berba 2020. godine. Zemlja podrijetla ružmarina je Indija, dok je zemlja podrijetla origana Austrija.

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab, ST60T, Hrvatska)
- Vorteks (Biosan Vorteks V1 Plus, Latvija)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S12, Engleska)
- Zetasizer ultra (Malvern Panalytical Limited ZSU3305, Velika Britanija)
- Mikroskop (BTC Tyle LCD – 35, Bresser, Njemačka)
- Uljna kupelj s integriranom mješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- OMNI TH220-PCRH homogenizator (Omni International, SAD)
- Magnetska mješalica (Heidolph Instruments, Njemačka)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)

Pribor:

- Staklene čaše (100, 200, 500, 1000 mL)
- Stakleni štapić

- Kivete od kvarcnog stakla
- Staklene epruvete
- Eppendorf epruvete
- Menzure
- Automatske pipete (10-100 μL , 100-1000 μL , 1-10 ml)
- Odmjerna tikvica (250, 500 ml)
- Predmetno stakalce
- Sustav za vakuum filtraciju
- Filter papir (Rundfilter, MN 640 m dia 11 cm) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- celulozni filter papir (veličine pora 5-13 μm , LLG Labware Meckenheim, Njemačka)

3.1.3. Kemikalije

Otapala i reagensi koji su korišteni za eksperimentalni dio rada:

- Destilirana voda
- Proteinski prah graška iz ekološkog uzgoja (Nutrigold, Hrvatska)
- Suncokretovo ulje (VitaDor, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3 ; Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- Galna kiselina ($\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$; Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$; Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Metanol (CH_3OH , Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$; Sigma-Aldrich, Rusija)
- Klorovodična kiselina (HCl ; Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska)
- Natrijev acetat-trihidrat ($\text{CH}_3\text{COOH} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; Gram-Mol, Hrvatska)
- Koncentrirana octena kiselina (CH_3COOH ; T.T.T. d.o.o., Hrvatska)
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_6$; Sigma-Aldrich, Švicarska)
- Željezov (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; Gram-Mol, Hrvatska)
- Željezov (II) sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich, Njemačka)
- α -amilaza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Pankreatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)

- Pepsin (Fisher Scientific UK, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Žučne soli (Sigma-Aldrich, Auckland, Novi Zeland)
- Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogen karbonat (NaHCO_3) p.a. (Franck, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid (NaCl) p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Kalcijev klorid (CaCl_2) p.a. (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vodenih biljnih ekstrakata origana i ružmarina

U staklenu čašu volumena 1000 mL odvaže se 12 g usitnjenog osušenog ružmarina odn. origana i prelije sa 600 mL destilirane vode, prethodno zagrijane na 80 °C. Tako pripremljena smjesa termostatira se u uljnoj kupelji s integriranom miješalicom (HBR 4, digital, IKA-Werke, Njemačka) pri brzini miješanja 250 rpm, tijekom 30 minuta. Nakon ekstrakcije, uzorak se filtrira pomoću sustava za vakuum filtraciju, koristeći celulozni filter papir (veličine pora 5-13µm, LLG Labware Meckenheim, Njemačka), kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze. Tako pripremljeni vodeni ekstrakti koristili su se za pripremu emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljke s dodatkom emulgatora (protein graška).

3.2.2. Priprema suspenzija proteina graška u vodenim ekstraktima ružmarina odnosno origana

Suspenzija proteina graška u vodenim biljnim ekstraktima pripremana je prema metodi autora Sridharan i sur. (2020), s malom modifikacijom metode. Kako bi se pripremila 1 % - tna koncentracija proteina graška, u odgovarajući volumen vodenog biljnog ekstrakta ružmarina odn. origana doda se odgovarajuća masa proteinskog praha graška iz kontroliranog organskog uzgoja (Nutrigold, Hrvatska). Tako pripremljena suspenzija homogenizira se na magnetskoj miješalici pri brzini miješanja 500 rpm, tijekom nekoliko minuta. pH vrijednost suspenzije podese se na 7 dodatkom nekoliko kapi NaOH (0,5 M). Nakon podešavanja pH vrijednosti, suspenzija se filtrira pomoću sustava za vakuum filtraciju koristeći filter papir (Rundfilter, MN 640 m dia 11 cm, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Iz tako pripremljene 1 %-tne

koncentracije proteina graška u vodenim ekstraktima ružmarina odn. origana, razrjeđivanjem sa destiliranom vodom, pripremale su se 0,1 % i 0,5 % koncentracije proteina graška u vodenim ekstraktima ružmarina odn. origana.

3.2.3. Određivanje koncentracije komercijalnog proteina graška Bradfordovom metodom koji sadrži boju Coomassie Brilliant Blue R-250

Kako bi se odredile stvarne koncentracije proteina u 1 %-tnoj, 0,5 %-tnoj i 0,1 %-tnoj suspenziji proteina graška u vodenim biljnim ekstraktima, korištena je Bradfordova metoda.

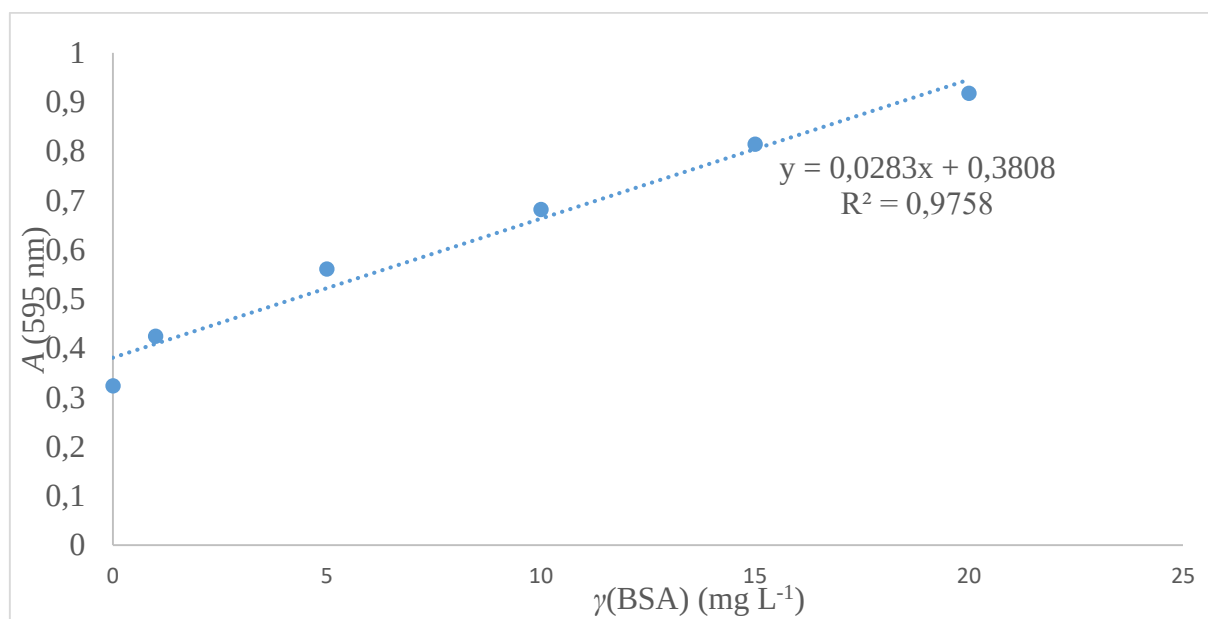
Bradfordov test temelji se na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue G-250 sadržane u reagensu na proteine te je vrlo brz, jednostavan i osjetljiv, zbog čega je često korišten za određivanje koncentracije proteina. U ovom radu korišten je Bradford test koji je modificiran, odnosno lineariziran prema protokolu opisanom u radu Ernst i sur. (2010).

Izrada baždarnog pravca:

Potrebno je pripremiti 1 mL otopine goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) koncentracije 1 mg mL⁻¹. Zatim se početna otopina od 1 mg mL⁻¹ razrjeđuje deset puta da bi se dobila koncentracija od 0,1 mg mL⁻¹ (1 mL otopine + 9 mL ultračiste vode).

Iz te otopine pripremaju se razrjeđenja od 0; 1; 5; 10; 15; 20 mg L⁻¹ za baždarni pravac.

Zatim se izmjeri apsorbanca praznih plastičnih kiveta, slijedi dodavanje otopine BSA odgovarajućih razrjeđenja, nakon toga se dodaje 500 µL Bradford reagensa, vortexira se otopina i nakon 10 minuta spektrofotometrijski se izmjeri apsorbancija uzorka pri 595 nm. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele te se kao rezultat uzima njihova srednja vrijednost. Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunava se koncentracija proteina.



Slika 2. Baždarni pravac za Bradfordovu metodu

gdje je:

x – koncentracija proteina (mg L^{-1})

y – apsorbancija pri 595 nm

R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.4. Priprema emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom emulgatora

Priprema emulzija ulje u vodenim ekstraktima origana i ružmarina provedena je prema uvjetima koji su definirani Box-Behnkenovim planom eksperimenta (tablica 1). U falcon epruvete volumena 15 mL otpipetira se odgovarajući volumen vodenog ekstrakta ružmarina odnosno origana koji sadrži odgovarajuće koncentracije emulgatora (komercijalni proteini graška) te odgovarajući volumen suncokretovog ulja. Tako pripremljena smjesa homogenizira se pomoću homogenizatora (OMNI TH220-PCRH homogenizator, Omni International, SAD) tijekom 4 minute nakon čega se emulzijama mjeri zeta potencijal i vodljivost uređajem koji se zove Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Limited ZSU3305, Velika Britanija).

Nakon što su određeni optimalni uvjeti za pripremu emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina odnosno origana, isti optimalni uvjeti su se koristili za pripremu emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina i origana koje su korištene u nastavku eksperimenta, za *in vitro* simulaciju probavnog sustava.

Tablica 1. Plan eksperimenta za pripremu emulzija

Broj pokusa	Koncentracija ulja u vodenom ekstraktu ružmarina odn. origana [% w/w]	Koncentracija emulgatora [% w/w]	Brzina mješanja [rpm]
1	10	0,10	25000
2	25	0,10	25000
3	10	1,00	25000
4	25	1,00	25000
5	10	0,50	15000
6	25	0,50	15000
7	10	0,50	35000
8	25	0,50	35000
9	15	0,10	15000
10	15	1,00	15000
11	15	0,10	35000
12	15	1,00	35000
13	15	0,50	25000
14	15	0,50	25000
15	15	0,50	25000
16	15	0,50	25000
17	15	0,50	25000

3.2.5. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1995). Sušenje se odvija na način da se određena količina biljnog materijala ($1 - 5 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$) odvaže u u suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem (prethodno izvaganu s točnošću $\pm 0,0002 \text{ g}$). Posudica s biljnim materijalom se suši u sušioniku sa skinutim poklopcem na 105 °C, 3 sata. Nakon završetka sušenja, poklopci se vraćaju na posudicu i posudice s poklopcem se izvade iz sušionike i hlade oko 30 minuta u eksikatoru. Nakon

hlađenja, posudice se važu te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

Izračun:

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

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

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode}$$

Gdje su:

a– masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b– masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m–masa uzorka (g).

Na ispitivanom uzorku moraju se obaviti minimalno dva određivanja te se ona ne smiju razlikovati za više od 0,2 % obzirom na udio vode, odnosno suhe tvari.

3.2.6. Određivanje fizikalnih svojstava pripremljenih emulzija u vodenim ekstraktima origana i ružmarina

3.2.6.1. *Određivanje zeta potencijala, vodljivosti te ukupnih otopljenih tvari*

Nakon što su emulzije pripremljene, određen im je zeta potencijal te su im izmjerene vrijednosti vodljivosti. Odmah nakon emulgiranja, 200 µL uzorka, prethodno razrijeđenog 200x prenese se plastičnom špricom od 1 mL u omega kivetu te se zeta potencijal i vodljivost mjere na uređaju Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Limited ZSU3305, Velika Britanija). Za svaki uzorak provode se tri mjerenja te se kao rezultat uzima srednja vrijednost.

Ukupne otopljene tvari (engl. *Total Dissolved Solids*, TDS) određene su primjernom konduktometra (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska) sa sondom koja se uroni u uzorak (vodeni biljni ekstrakt odn. emulzija ulje u vodenim ekstraktima biljaka) pri čemu se očitaju vrijednosti TDS-a. Uzorci su prije svakog mjerenja homogenizirani na vorteksu (BiosanVortex V1 Plus, Latvija). Za svaki uzorak provode se dva mjerenja te se kao rezultat uzima srednja vrijednost.

3.2.6.2. *Određivanje prosječnog Feretovog promjera kapljica u emulziji ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana*

Feretov promjer je okomita udaljenost između dvije tangente na suprotnim stranama čestice (Wang i Zheng, 2017). Prosječan Feretov promjer kapljica emulzije određen je računalnom obradom slika kapljica emulzija čija je obrada provedena na probnoj verziji programa ImageJ (v 1.8.0. NIH, Maryland, SAD).

ImageJ je program za analizu slika koji sadrži mnoštvo različitih opcija za njihovu morfološku obradu te za određivanje raznih parametara objekata koji se žele analizirati. Slike za analizu slikane su mikroskopom s fotoaparatom (BTC Tyle LCD – 35, Bresser, Njemačka) neposredno nakon što su pripremljene emulzije ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana. Na svakoj slici analizirano je ukupno 30 kapljica s time da su u obzir uzimane samo one cjelovite (koje ulaze u granice slike). Feretov promjer je zatim određen kao prosječna vrijednost 30 mjerenja Feretovih promjera kapljica emulzija (Ivanković, 2020).

3.2.7. *In vitro* simulacija probavnog sustava

In vitro simulacija probavnog sustava provedena je prema metodi autora Ortega i sur. (2011). Prvi korak uključuje simulaciju uvjeta u ustima. Izvaže se 40 mg enzima α -amilaze koji se otopi u 40 mL fosfatnog pufera, prethodno termostetiranog na 37 °C, uz dodatak soli (0,04 % w/w NaCl i 0,004 % w/w CaCl₂). Pripremljena smjesa stavi se u uljnu kupelj i zagrije na 37 °C te se pri postignutoj temperaturi u smjesu doda 4 mL vodenih ekstrakata ružmarina i origana odn. pripremljene emulzije ulja u vodenim biljnim ekstraktima. Nakon petominutne inkubacije izuzeto je 1 mL uzorka iz reakcijske smjese.

Drugi korak uključuje simulaciju uvjeta probave u želucu. pH vrijednost reakcijske smjese podesi se na pH = 2 postepenim dodavanjem klorovodične kiseline (37 %), nakon čega slijedi dodavanje suspenzije enzima pepsina (60 mg pepsina otopljenog u 4 mL 0,01 mol L⁻¹ HCl). Reakcijska smjesa inkubira se 2 sata pri 37 °C. Nakon dva sata iz reakcijske smjese izuzeto je 1 mL uzorka.

Treći korak uključuje simulaciju uvjeta u tankom crijevu (duodenum). pH vrijednost reakcijske smjese podesi se na pH = 6,5 dodatkom NaHCO₃, nakon čega slijedi dodavanje suspenzija pankreatina (0,08 g pankreatina otopljenog u 10 mL fosfatnog pufera) i žučnih soli (0,5 g žučnih soli otopljenih u 10 mL fosfatnog pufera). Reakcijska smjesa inkubira se 2 sata pri 37 °C. Nakon

dva sata iz reakcijske smjese izuzeto je 1 mL uzorka.

Nakon svakog provedenog koraka, uzorci su profiltrirani, odmah stavljeni na hlađenje (smjesa leda i vode) te su im određena fizikalna (ukupne otopljene tvari, vodljivost) i kemijska (ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodama) svojstva (Đurđević, 2020).

3.2.8. Određivanje kemijskih svojstava vodenih biljnih ekstrakata i emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana

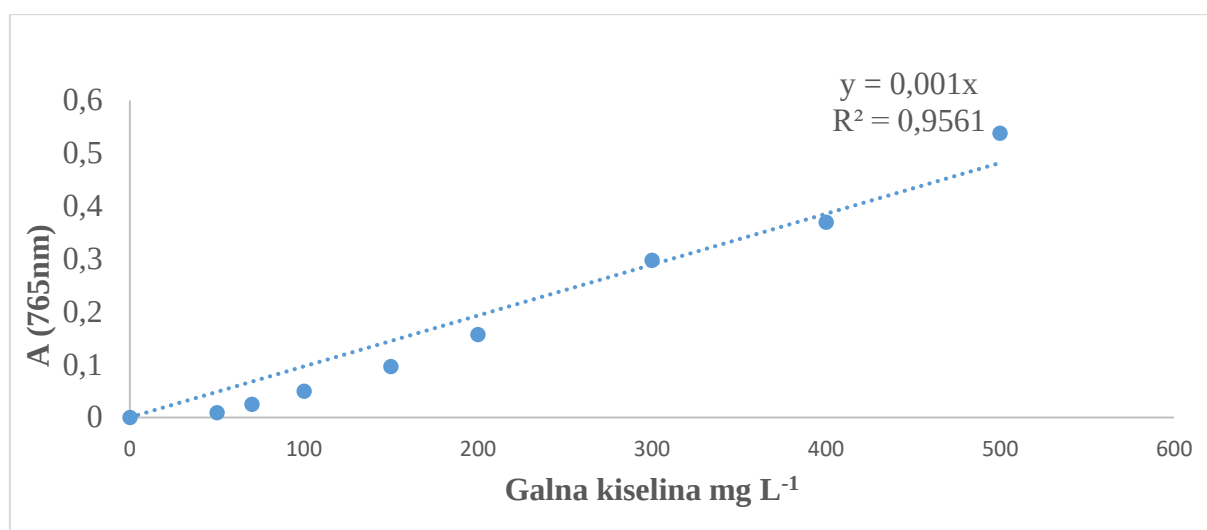
3.2.8.1. *Određivanje udjela ukupnih polifenola*

Udio ukupnih polifenola određivan je spektrofotometrijski metodom koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (Ivanković, 2020). U staklenu epruvetu otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele te se kao rezultat uzima njihova srednja vrijednost. Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te uzorci stoje ukupno 2 sata na tamnom mjestu nakon čega se mjeri apsorbancija plavog obojenja pomoću spektrofotometra na valnoj duljini od 765 nm.

Slijepa proba priprema se na isti način, uz razliku da se umjesto 100 μL uzorka dodaje jednaka količina destilirane vode. Udio ukupnih polifenola izračunava se na temelju jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (slika 3), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline po volumenu ili masi uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Za izračun udjela ukupnih polifenola potrebno je izraditi baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji polifenola (slika 3). Potrebno je pripremiti otopinu galne kiseline koncentracije 0,5 g L^{-1} . Da bi ju pripremili, izvaže se 0,0127 g galne kiseline i otopi u 25 mL destilirane vode. Iz te se otopine onda pripremaju razrjeđenja i dobivaju se otopine galne kiseline koncentracije 0-400 mg L^{-1} . Reakcijska smjesa uzorka sadrži 100 μL otopine galne kiseline poznate koncentracije. Također se za svaki uzorak pripremaju dvije paralele te se kao rezultat uzima njihova srednja vrijednost. Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunava se koncentracija ukupnih polifenola.



Slika 3. Baždarni pravac za galnu kiselinu

gdje je:

x – kocentracija galne kiseline (mgL⁻¹)

y – apsorbancija pri 765 nm

R^2 – koeficijent determinacije.

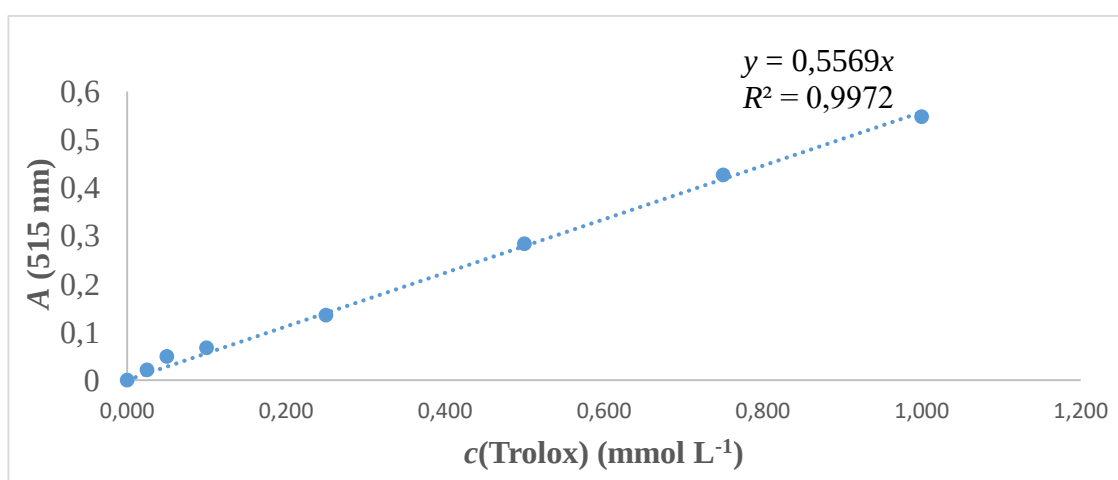
3.2.8.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Potrebno je pripremiti otopinu 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) koncentracije 0,094 mmol L⁻¹ u metanolu. Nakon što je otopina pripremljena, u staklenu epruvetu otpipetira se 100 μ L uzorka te se doda 3,9 mL otopine DPPH i dobro se homogenizira. Nakon što se doda DPPH, reakcija se odvija 30 minuta u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 515 nm. Osim uzoraka, priprema se i slijepa proba na jednak način, samo što se umjesto 100 μ L uzorka dodaje 100 μ L metanola. Za svaki uzorak pripreme se dvije paralele, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost mjerenja. Antioksidacijska aktivnost računa se na temelju jednadžbe baždarnog pravca Troloxa, a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Troloxa po gramu suhe tvari uzorka (Ivanković, 2020) (slika 4).

Izrada baždarnog pravca:

Baždarni pravac se izrađuje po istom protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom na način da se umjesto 100 μ L uzorka otpipetira 100 μ L otopine Troloxa

poznate koncentracije. Ishodišna otopina Troloxa (1 mmol L^{-1}) priprema se tako da se 0,0185 g Troloxa otopi u 500 mL metanola nakon čega se njezin razrjeđivanjem pripremaju koncentracije 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 mmol L^{-1} . Za svaki se uzorak pripremaju dvije paralelne probe te se kao rezultat uzima srednja vrijednost njihovih mjerenja. Promjena apsorbancije računa se tako što se od apsorbancije slijepe probe oduzme apsorbancija uzorka s Troloxom. Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunava se antioksidacijska aktivnost uzoraka DPPH metodom (slika 4).



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

gdje je:

x – ekvivalent Troloxa (mmol L^{-1})

y – razlika slijepe probe i apsorbancije uzoraka pri 515 nm

R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.8.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Za provođenje ove metode potrebno je prvo pripremiti FRAP reagens. On se priprema tako da se pripremi acetatni pufer koncentracije 300 mmol L^{-1} , otopina 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ) koncentracije 10 mmol L^{-1} te vodena otopina željezovog(III) klorida heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) koncentracije 20 mmol L^{-1} te se pripremljene otopine pomiješaju u omjeru 10:1:1 (Ivanković, 2020).

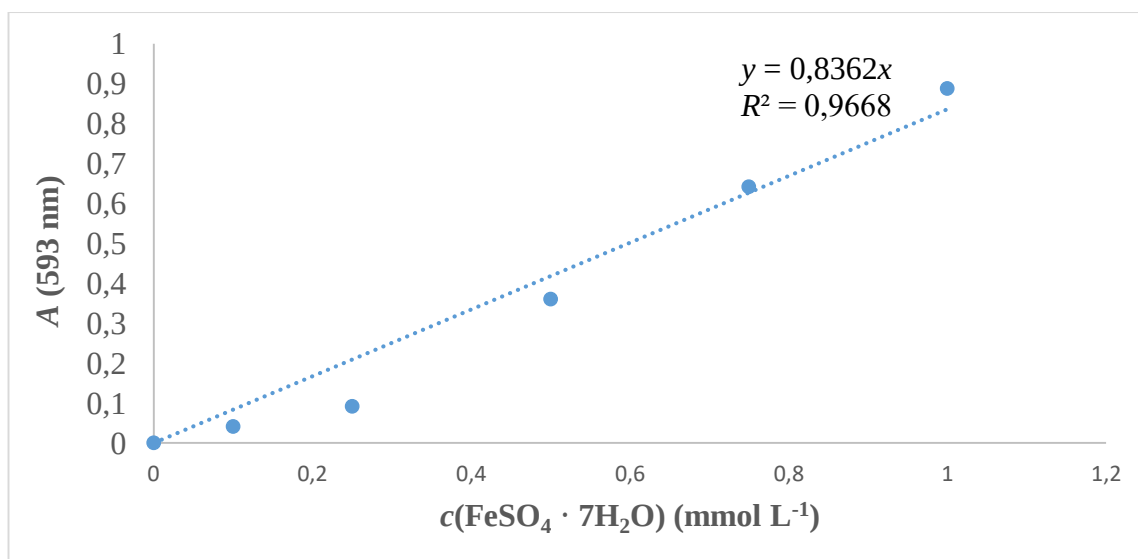
Nakon što je pripremljen FRAP reagens, u staklenu epruvetu doda se $50 \mu\text{L}$ uzorka te $950 \mu\text{L}$

FRAP reagensa, homogenizira se i nakon 4 minute mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Osim uzoraka, priprema se i slijepe proba na jednaka način, samo što se umjesto 50 μL uzorka dodaje 50 μL destilirane vode. Za svaki se uzorak pripreme dvije paralele, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost mjerenja.

Antioksidacijska aktivnost računa se na temelju jednadžbe baždarnog pravca $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ po volumenu ili masi uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Baždarni pravac se izrađuje po istom protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom na način da se umjesto 50 μL uzorka otpipetira 50 μL otopine $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ poznate koncentracije. Ishodišna otopina $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol L^{-1}) priprema se tako da se izvaže 0,0069 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i otopi u 25 mL destilirane vode nakon čega se njezinim razrjeđivanjem pripremaju koncentracije 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 mmol L^{-1} . Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe i kao rezultat se uzima srednja vrijednost njihovih mjerenja. Promjena apsorbancije računa se tako da se od apsorbancije uzorka oduzme apsorbancija slijepe probe. Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunava se antioksidacijska aktivnost uzoraka FRAP metodom (slika 5).



Slika 5. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Gdje je:

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

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

R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.9. Metoda odzivnih površina

S ciljem određivanja optimalnih uvjeta procesa emulgiranja, primijenjena je metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*; RSM) koristeći program Statistica 14.0. (TIBCO® Statistica, SAD). Pomoću Box-Behnkenovog dizajna eksperimenta, ispitivao se utjecaj različitih procesnih faktora kao što su koncentracija emulgatora, brzina miješanja te koncentracija ulja u vodenom ekstraktu ružmarina odn. origana na kemijska svojstva pripremljenih emulzija (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodom). Svaki procesni faktor analiziran je na tri razine (koncentracija emulgatora: 0,1, 0,5 i 1 %, koncentracija ulja u biljnim vodenim ekstraktima: 10, 15 i 25 % te brzina miješanja: 15000, 25000, 35000 rpm). Za tri faktora na tri razine, algoritam predlaže 17 eksperimenata (tablica 1).

3.2.10. Analiza varijance (ANOVA)

Kako bi se ispitaio učinak parametara procesa pripreme emulzije ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom emulgatora (koncentracija ulja, koncentracija emulgatora, brzina miješanja) na odziv (kemijska svojstva pripremljenih emulzija: UF, DPPH, FRAP) primijenjena je analiza varijance ANOVA, u programu Statistica 14.0. (TIBCO® Statistica, SAD) s razinom značajnosti ($p < 0,05$). ANOVA, kao statistička metoda, testira međuovisnosti parametara procesa odn. računa razliku dvije ili više grupa nezavisnih varijabli s obzirom na jednu (zavisnu) varijablu (Pfaff i Salopek, 2004).

Kako bi se opisali eksperimentalni podaci izmjerenih kemijskih svojstava (UF, DPPH, FRAP) za pripremljene emulzije ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom emulgatora, razvijeni su predikcijski modeli. Kao pokazatelj prilagodbe modela eksperimentalnim podacima, izračunat je koeficijent determinacije (R^2).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju, provedena je klasična ekstrakcija kruto – tekuće biološki aktivnih spojeva ružmarina i origana sa svrhom dobivanja vodenih biljnih ekstrakata za pripremu emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina i origana s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora. Primjenom metode odzivnih površina (RSM), s ciljem definiranja parametara procesa emulgiranja koji bi osigurali optimalne vrijednosti kemijskih svojstava pripremljenih emulzija, definiran je plan eksperimenta. Pomoću Box-Behnkenovog plana eksperimenta, ispitan je utjecaj koncentracije emulgatora (0,1; 0,5; 1 %), udjela uljne faze (10; 15; 25 %) te brzine miješanja (15000; 25000; 35000 rpm) na kemijske karakteristike pripremljenih emulzija (TPC, antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodom). Stvarna koncentracija proteina graška za vodeni ekstrakt ružmarina odn. origana određena je Bradfordovom metodom kako bismo znali početne vrijednosti proteina prilikom pripreme emulzije. Za 1 % -tnu pripremljenu suspenziju proteina graška u vodenom ekstraktu ružmarina iznosi 767,49 mg L⁻¹, za 0,5 % -tnu iznosi 484,81 mg L⁻¹, a za 0,1 % -tnu 74,91 mg L⁻¹. Što se tiče vodenog ekstrakta origana za 1 % -tnu iznosi 1283,39 mg L⁻¹, za 0,5 % -tnu iznosi 682,69 mg L⁻¹, a za 0,1 % -tnu iznosi 279,86 mg L⁻¹. Plan eksperimenta za pripremu emulzija prikazan je u tablici 1. Dobivenim uzorcima određivana su fizikalna i kemijska svojstva.

Od fizikalnih svojstava, mjereni su zeta potencijal i vodljivost emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana i ružmarina s dodatkom proteina graška kao emulgatora (tablica 2). Također, nakon što su emulzije pripremljene, proučavana je veličina kapljica u emulziji, izražena kao prosječni Feretov promjer (slika 10) dok slike 8. i 9. pokazuju mikroskopski prikaz trenutnog stanja kapljica emulzija dobivenih pri različitim eksperimentalnim uvjetima (pokusi 1- 17). Od kemijskih svojstava, pripremljenim emulzijama određivani su ukupni fenoli (TPC) te antioksidacijska aktivnost (DPPH i FRAP) što je prikazano u tablici 3. Rezultati optimiranja procesa emulgiranja s obzirom na TPC, DPPH i FRAP prikazani su na slikama 6 i 7, dok su regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije (R^2) dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenta za kemijska svojstva emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina odn. origana uz dodatak emulgatora prikazani u tablicama 4 i 5.

Pri dobivenim optimalnim vrijednostima parametara procesa emulgiranja (koncentracija emulgatora, udio uljne faze, brzina miješanja), pripremljene su emulzije ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana te je provedena *in vitro* simulacija probavnog sustava. Rezultati dobiveni mjerenjem fizikalnih (ukupne otopljene tvari, vodljivost) i kemijskih svojstava (UF, DPPH i FRAP) tekućih i emulgiranih biljnih ekstrakata nakon završene *in vitro* probave

prikazani su u tablici 6 i na slikama 11-16. Na temelju podataka dobivenih kemijskom analizom (UF, DPPH, FRAP) izračunata je biodostupnost za svaku vrstu biljnog uzorka odn. emulzije i prikazana u tablici 7.

4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA

Zeta potencijal ili elektrokinetički potencijal je parametar koji opisuje elektrokemijsku ravnotežu na površini čestica i ovisi o svojstvima tekućina i površine. Emulzije čija je vrijednost zeta potencijala manja od -30 mV i veća od +30 mV smatraju se stabilnima (Larsson i sur., 2012). Što je zeta potencijal niži, jače je elektrostatsko odbijanje, odnosno sustav je stabilniji (Tomic, 2021) što ukazuje da se zeta potencijal može koristiti za predviđanje i kontroliranje stabilnosti emulzije (Ivanković, 2020).

Vrijednosti zeta potencijala i vodljivosti dobivene ovim istraživanjem prikazane su u tablici 2. Iz rezultata se može vidjeti kako kod biljke ružmarina uzorak broj 8 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) pokazuje najmanju vrijednost zeta potencijala ($-67,22 \pm 2,24$ mV) što ukazuje na najveću stabilnost pripremljene emulzije. S druge strane, uzorak broj 12 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 1 %) pokazuje najveću vrijednost zeta potencijala ($-38,52 \pm 3,28$ mV) što ukazuje da je emulzija pripremljena pod uvjetima pokusa br. 12 najmanje stabilna. Međutim raspon zeta potencijala (od $-67,22 \pm 2,24$ mV do $-38,52 \pm 3,28$ mV) ukazuje kako su sve pripremljene emulzije stabilne (vrijednost im je niža od -30 mV). Vrijednosti vodljivosti se kreću u rasponu od $0,0043 \pm 0,00$ mS cm⁻¹ za uzorak broj 11 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 15%, koncentracija emulgatora 0,1%) do $0,0453 \pm 0,05$ mS cm⁻¹ za uzorak broj 8 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %).

Za emulzije pripremljene s vodenim ekstraktom origana, najmanju vrijednost zeta potencijala pokazuje također uzorak broj 8 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) ($-57,18 \pm 4,47$ mV) što ukazuje na najveću stabilnost pripremljene emulzije. Najmanje stabilan je uzorak pod brojem 7 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 10 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) koji pokazuje najveće vrijednosti zeta potencijala ($-37,71 \pm 2,31$ mV). Vodljivost se kreće u rasponu od $0,0051 \pm 0,00$ mS cm⁻¹ za uzorak broj 1 (brzina miješanja 25000 rpm, udio uljne faze 10 %, koncentracija emulgatora 0,1 %) do $0,0499 \pm 0,05$ mS cm⁻¹ za uzorak broj 6 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 25

%, koncentracija emulgatora 0, 5%).

Uspoređujući vrijednosti zeta potencijala emulzija pripremljenih s vodenim ekstraktima ružmarina i origana, može se vidjeti kako je uzorak br. 8 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) s emulzijom koja je pripremljena s vodenim ekstraktom ružmarina najstabilniji ($-67,22 \pm 2,24$ mV) dok je najmanju stabilnost pokazao uzorak br. 7 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 10 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) odn. emulzija pripremljena s vodenim ekstraktom origana ($-37,71 \pm 2,31$ mV).

Ono što treba naglasiti je da se vrijednosti zeta potencijala emulzija pripremljenih s vodenim ekstraktima ružmarina odn. origana značajno ne razlikuju, budući da se njihove vrijednosti kreću u rasponu od $-37,71 \pm 2,31$ mV do $-67,22 \pm 2,24$ mV ukazujući na stabilnost pripremljenih emulzija s vodenim ekstraktima obiju biljaka. Takvi rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Hinderink i sur. (2019) u kojem su pripremane emulzije koje su sadržavale 1 % pročišćenih proteina graška te im je određivan zeta potencijal. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su negativne vrijednosti zeta potencijala odn. niže od -30 mV čak i nakon 14 dana što ukazuje da je elektrostatsko odbijanje visoko, odnosno da su pripremljene emulzije stabilne.

Uspoređujući rezultate iz ovog rada s rezultatima istraživanja koje je provedeno u radu Ivanković (2020) možemo vidjeti kako emulzije ulja u vodenim biljnim ekstraktima pripremljene s prirodnim emulgatorom (komercijalni proteini graška) imaju veću stabilnost od emulzija ulja u vodenim biljnim ekstraktima s dodatkom PEG emulgatora. Naime, raspon vrijednosti zeta potencijala za emulzije ulja u vodenim ekstraktima ružmarina kreće se od $-67,22 \pm 2,24$ mV do $-38,52 \pm 3,28$ mV, dok je raspon za emulzije ulja u vodenim ekstraktima origana od $-57,18 \pm 4,47$ mV do $-37,71 \pm 2,31$ mV. S druge strane, raspon vrijednosti zeta potencijala emulzija ulja u vodenim biljnim ekstraktima s dodatkom komercijalnog PEG emulgatora kreće se u rasponu od $-32,13 \pm 1,56$ mV do $-17,40 \pm 0,89$ mV za PEG1500, zatim u rasponu od $-31,86 \pm 0,95$ mV do $-25,08 \pm 0,72$ mV za PEG 6000, te od $-23,40 \pm 0,12$ mV do $-17,68 \pm 0,45$ za PEG 20000 (Ivanković, 2020).

Ako se uspoređuju vrijednosti vodljivosti emulzija pripremljenih s vodenim ekstraktima ružmarina i origana, najviše vrijednosti pokazuje uzorak origana broj 6 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) odn. emulzija pripremljena s vodenim ekstraktom origana ($0,0499 \pm 0,05$ mS cm⁻¹) te uzorak ružmarina broj 8 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) odn. emulzija pripremljena s vodenim ekstraktom ružmarina ($0,0453 \pm 0,05$ mS cm⁻¹). Takvi rezultati nisu u potpunosti u skladu s istraživanjem provedenim od strane Chena i sur. (2011) koji u svojem istraživanju navode kako se vodljivost povećava povećanjem udjela vodene faze, s obzirom da

uzorci emulzija broj 6 i 8 sadrže manji udio vode od ostalih uzoraka, odnosno sadrže 25 % uljne faze.

Tablica 2. Fizikalna svojstva emulzija ulja u vodenim ekstraktima origana i ružmarina s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora

UZORAK	ZETA POTENCIJAL (mV)		VODLJIVOST (mS cm ⁻¹)	
	RUŽMARIN	ORIGANO	RUŽMARIN	ORIGANO
1	-43,22 ± 1,76	-42,47 ± 2,73	0,0063 ± 0,00	0,0051 ± 0,00
2	-49,91 ± 3,37	-45,2 ± 0,95	0,0067 ± 0,00	0,0075 ± 0,00
3	-51,14 ± 2,87	-52,28 ± 1,35	0,0098 ± 0,00	0,0164 ± 0,02
4	-47,07 ± 1,98	-48,65 ± 2,78	0,0104 ± 0,01	0,0112 ± 0,01
5	-48,32 ± 1,41	-43,09 ± 2,45	0,0117 ± 0,01	0,0093 ± 0,00
6	-41,37 ± 4,50	-46,97 ± 3,76	0,0103 ± 0,01	0,0499 ± 0,05
7	-51,77 ± 0,67	-37,71 ± 2,31	0,0301 ± 0,03	0,0099 ± 0,00
8	-67,22 ± 2,24	-57,18 ± 4,47	0,0453 ± 0,05	0,0286 ± 0,03
9	-39,53 ± 0,26	-51,39 ± 3,53	0,0234 ± 0,02	0,0064 ± 0,00
10	-46,29 ± 5,87	-43,94 ± 1,73	0,0114 ± 0,01	0,0177 ± 0,01
11	-40,5 ± 1,84	-50,41 ± 1,20	0,0043 ± 0,00	0,0052 ± 0,00
12	-38,52 ± 3,28	-45,6 ± 3,98	0,0092 ± 0,00	0,0168 ± 0,02
13	-49,67 ± 2,88	-52,21 ± 1,92	0,0223 ± 0,02	0,0098 ± 0,00
14	-48,02 ± 2,95	-56,92 ± 1,22	0,0251 ± 0,03	0,0179 ± 0,02
15	-45,2 ± 2,16	-51,54 ± 3,50	0,0072 ± 0,00	0,0099 ± 0,00
16	-46,11 ± 0,60	-56,24 ± 2,48	0,0148 ± 0,01	0,0128 ± 0,01
17	-42,95 ± 3,73	-53,32 ± 0,30	0,0098 ± 0,01	0,0094 ± 0,00

4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA

Nakon određivanja fizikalnih svojstava, analizirana su kemijska svojstva emulzija ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom emulgatora. Određivani su ukupni polifenoli (UF) Folin-Ciocalteu metodom te antioksidacijska aktivnost DPPH i FRAP metodom. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3.

Uzimajući u obzir emulzije ulja u vodenom ekstraktu ružmarina, najveću vrijednost ukupnih polifenola ($53,93 \pm 0,76 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) ima uzorak broj 10 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 1 %), dok najmanju vrijednost ($1,35 \pm 1,14 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) ima uzorak pod brojem 2 (brzina miješanja 25000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,1 %). Uzorci 13-17 koji su miješani istom brzinom miješanja (25000 rpm) te su pripremani s istim udjelom uljne faze (15 %) i istom koncentracijom emulgatora (0,5 %) imaju slične vrijednosti ukupnih polifenola koje se kreću u rasponu od $14,02 \pm 0,76$ do $22,92 \pm 3,43 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$. Što se emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana tiče, uzorak broj 3 (brzina miješanja 25000 rpm, udio uljne faze 10 %, koncentracija emulgatora 1 %) ima najveću vrijednost ukupnih polifenola ($113,79 \pm 1,9 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), dok najnižu vrijednost ($6,68 \pm 0,00 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) ima uzorak broj 11 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 0,1 %). Uzorci 13-17 koji su pripremljeni s istim omjerima emulgatora i ulja te su imali istu brzinu miješanja (tablica 1), imaju slične vrijednosti ukupnih polifenola koje se kreću u rasponu od $45,90 \pm 1,18$ do $57,03 \pm 1,18 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$. Općenito gledajući, uzorci emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana imaju više vrijednosti ukupnih polifenola od emulzija ružmarina. Međutim, Vallverdù-Queralt i sur. (2013) proveli su istraživanje polifenolnog profila među najčešće korištenim začinskim biljem (ružmarin, timijan i origano) te su naveli kako najviše vrijednosti ukupnih polifenola sadrži ružmarin zatim timijan te origano.

Najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ($0,35 \pm 0,04 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) pokazuje emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina, pripremljena pri uvjetima pokusa broj 12 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 1 %). S druge strane, uzorak broj 11 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 0,1 %) pokazuje najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti ($0,06 \pm 0,01 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Uzorci 13-17 koji su pripremljeni s istim omjerima emulgatora i ulja te su imali istu brzinu miješanja (tablica 1), imaju slične vrijednosti

antioksidacijske aktivnosti (od $0,18 \pm 0,00$ do $0,23 \pm 0,02$ mmol_{Trolox} g_{s.tv.}⁻¹). Što se emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana tiče najveća DPPH vrijednost ($0,83 \pm 0,06$ mmol_{Trolox} g_{s.tv.}⁻¹) izmjerena je za uzorak koji je pripreman pri uvjetima pokusa broj 8 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %), a najmanja ($0,30 \pm 0,03$ mmol_{Trolox} g_{s.tv.}⁻¹) ima uzorak koji je pripreman pri uvjetima pokusa broj 6 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 25 %, koncentracija emulgatora 0,5 %). Uzorci emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana (uzorci 13 – 17) koji su miješani istom brzinom miješanja (25000 rpm) te su pripremani s istim udjelom uljne faze (15 %) i istom koncentracijom emulgatora (0,5 %) imaju slične DPPH vrijednosti (od $0,31 \pm 0,06$ do $0,35 \pm 0,04$ mmol_{Trolox} g_{s.tv.}⁻¹) uz iznimku uzorka broj 17 koji ima višu DPPH vrijednost ($0,69 \pm 0,46$ mmol_{Trolox} g_{s.tv.}⁻¹). Kao i u slučaju ukupnih polifenola, emulzije ulje u vodenom ekstraktu origana imaju nešto veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u odnosu na emulzije ružmarina.

Najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom ($0,49 \pm 0,03$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹) pokazuje emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina, pripremljena pri uvjetima pokusa broj 3 (brzina miješanja 25000 rpm, udio uljne faze 10 %, koncentracija emulgatora 1 %) dok najmanju vrijednost ($0,07 \pm 0,01$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹) pokazuje uzorak br. 9 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 0,1 %) (tablica 3). Uzorci 13–17, koji su pripremani pri istim eksperimentalnim uvjetima, imaju slične FRAP vrijednosti koje se kreću u rasponu od $0,29 \pm 0,00$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹ do $0,32 \pm 0,00$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹ uz iznimku uzorka broj 17 koji ima nešto nižu FRAP vrijednost ($0,13 \pm 0,01$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹). Što se tiče emulzija ulja u vodenom ekstraktu origana, najveću FRAP vrijednost ($1,01 \pm 0,08$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹) pokazuje uzorak br. 10 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 1 %) dok je najmanja vrijednost ($0,06 \pm 0,01$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹) postignuta za uzorak broj 1 (brzina miješanja 25000 rpm, udio uljne faze 10 %, koncentracija emulgatora 0,1 %). Uzorci emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana (13 – 17) koji su miješani istom brzinom miješanja te su pripremani s istim udjelom uljne faze i istom koncentracijom emulgatora (tablica 1) pokazuju slične FRAP vrijednosti (uzorci pod rednim brojem 13 – 16; od $0,48 \pm 0,08$ do $0,65 \pm 0,05$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹) uz iznimku uzorka br. 17 koji pokazuje nižu FRAP vrijednost ($0,36 \pm 0,00$ mmol_{FeSO₄·7H₂O} g_{s.tv.}⁻¹). Općenito gledajući, uzorci emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana imaju veću antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom nego emulzije ulja u vodenom ekstraktu ružmarina.

Takvi rezultati slažu se sa zaključkom kojeg su iznijeli Suk Kim i sur. (2012) kako uzorci koji sadrže veću količinu polifenola, pokazuju i veću antioksidacijsku aktivnost što inicira kako su

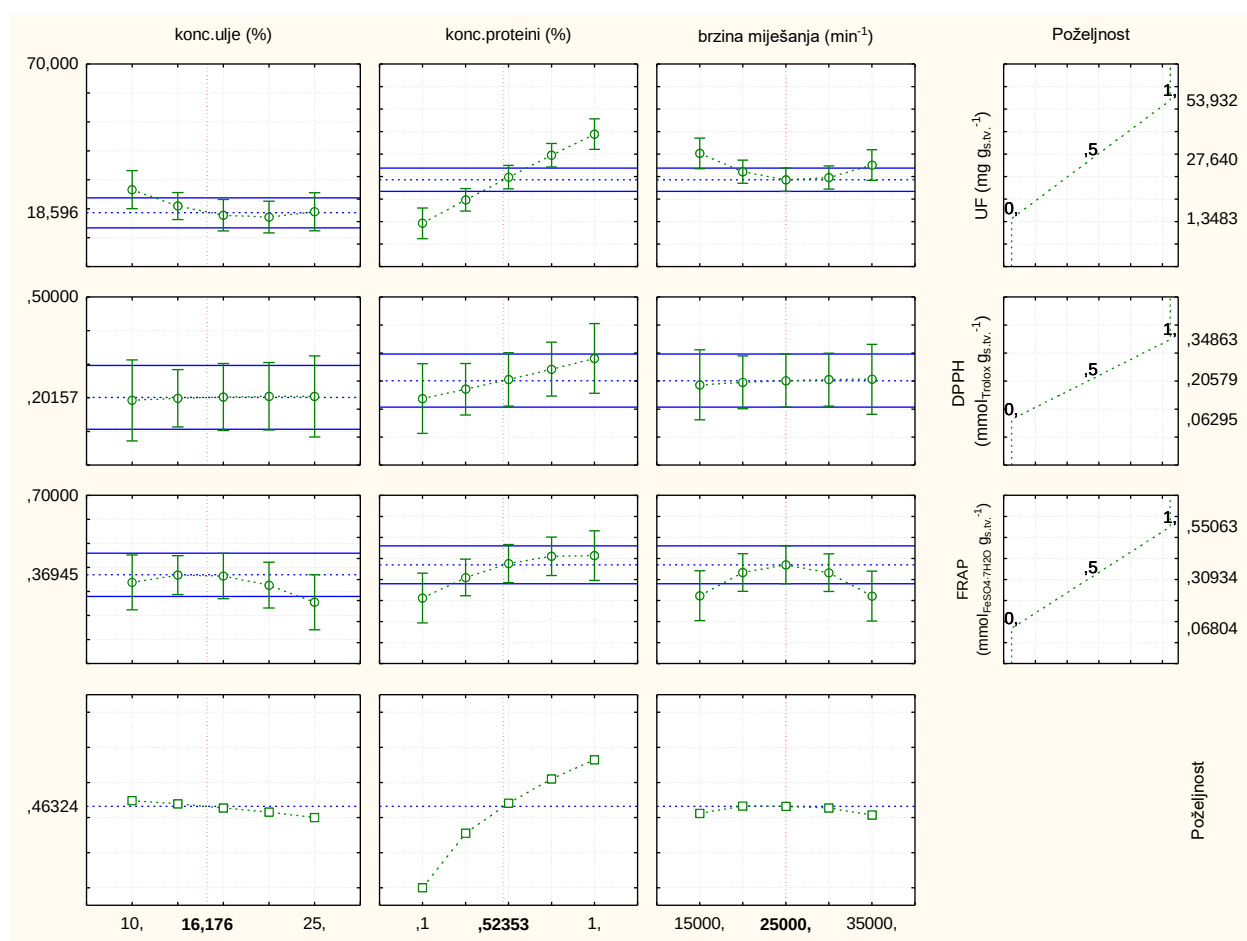
upravo polifenolne komponente glavni nositelji antioksidacijske aktivnosti u emulgiranim biljnim ekstraktima.

Tablica 3. Kemijska svojstva emulzija ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora

UZORAK	UF (mg _{GAE} g _{s.t.} ⁻¹)		DPPH (mmol _{Trolox} g _{s.tv.} ⁻¹)		FRAP (mmol _{FeSO4·7H2O} g _{s.tv.} ⁻¹)	
	RUŽMARIN	ORIGANO	RUŽMARIN	ORIGANO	RUŽMARIN	ORIGANO
1	7,01 ± 0,00	15,02 ± 2,36	0,08 ± 0,01	0,64 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01
2	1,35 ± 1,14	9,18 ± 1,18	0,32 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,02
3	50,97 ± 0,38	113,79 ± 1,90	0,30 ± 0,03	0,78 ± 0,01	0,49 ± 0,03	0,71 ± 0,11
4	33,71 ± 1,14	111,28 ± 2,40	0,13 ± 0,00	0,56 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,62 ± 0,00
5	37,48 ± 0,38	54,25 ± 1,18	0,17 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,43 ± 0,02
6	25,35 ± 3,05	53,97 ± 0,79	0,18 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,15
7	28,04 ± 1,53	55,92 ± 0,39	0,22 ± 0,05	0,80 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,01
8	32,63 ± 3,43	56,20 ± 1,57	0,19 ± 0,03	0,83 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,33 ± 0,02
9	13,75 ± 7,25	9,74 ± 0,39	0,07 ± 0,04	0,66 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,16 ± 0,01
10	53,93 ± 0,76	105,16 ± 1,60	0,33 ± 0,01	0,60 ± 0,00	0,26 ± 0,01	1,01 ± 0,08
11	3,51 ± 1,14	6,68 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,66 ± 0,03	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,00
12	45,57 ± 2,67	107,39 ± 6,30	0,35 ± 0,04	0,67 ± 0,04	0,24 ± 0,01	0,99 ± 0,04
13	22,92 ± 3,43	54,81 ± 0,39	0,18 ± 0,00	0,31 ± 0,06	0,32 ± 0,00	0,51 ± 0,00
14	22,65 ± 0,76	57,03 ± 1,18	0,18 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,29 ± 0,00	0,48 ± 0,08
15	17,53 ± 2,67	52,58 ± 2,75	0,20 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,65 ± 0,05
16	15,64 ± 1,53	56,48 ± 1,97	0,20 ± 0,04	0,35 ± 0,04	0,31 ± 0,01	0,55 ± 0,07
17	14,02 ± 0,76	45,90 ± 1,18	0,23 ± 0,02	0,69 ± 0,46	0,13 ± 0,01	0,36 ± 0,00

4.3. REZULTATI OPTIMIRANJA UVJETA EMULGIRANJA S OBZIROM NA KEMIJSKA SVOJSTVA EMULZIJA ULJE U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA

Kako bi se definirali optimalni uvjeti za pripremu emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom komercijalnog proteina graška, kao emulgatora, korištena je metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM). Analiziran je utjecaj tri varijable (koncentracija ulja, koncentracija proteina, brzina miješanja) na tri razine (koncentracija ulja = 10, 15, 25 %; koncentracija proteina = 0,1, 0,5, 1 % te brzina miješanja = 15000, 25000, 35000 rpm). Proces emulgiranja trajao je 4 minute.



Slika 6. Rezultati optimiranja uvjeta emulgiranja s obzirom na kemijska svojstva (UF, DPPH, FRAP) određena u pripremljenim emulzijama ulje u vodenom ekstraktu ružmarina, uz dodatak komercijalnog proteina graška, kao emulgatora

RSM se temelji na definiranju minimuma odzivne površine koji predstavlja optimalne uvjete procesa. Slike 6 i 7 predstavljaju dvodimenzionalne prikaze ovisnosti izlaznih varijabli i

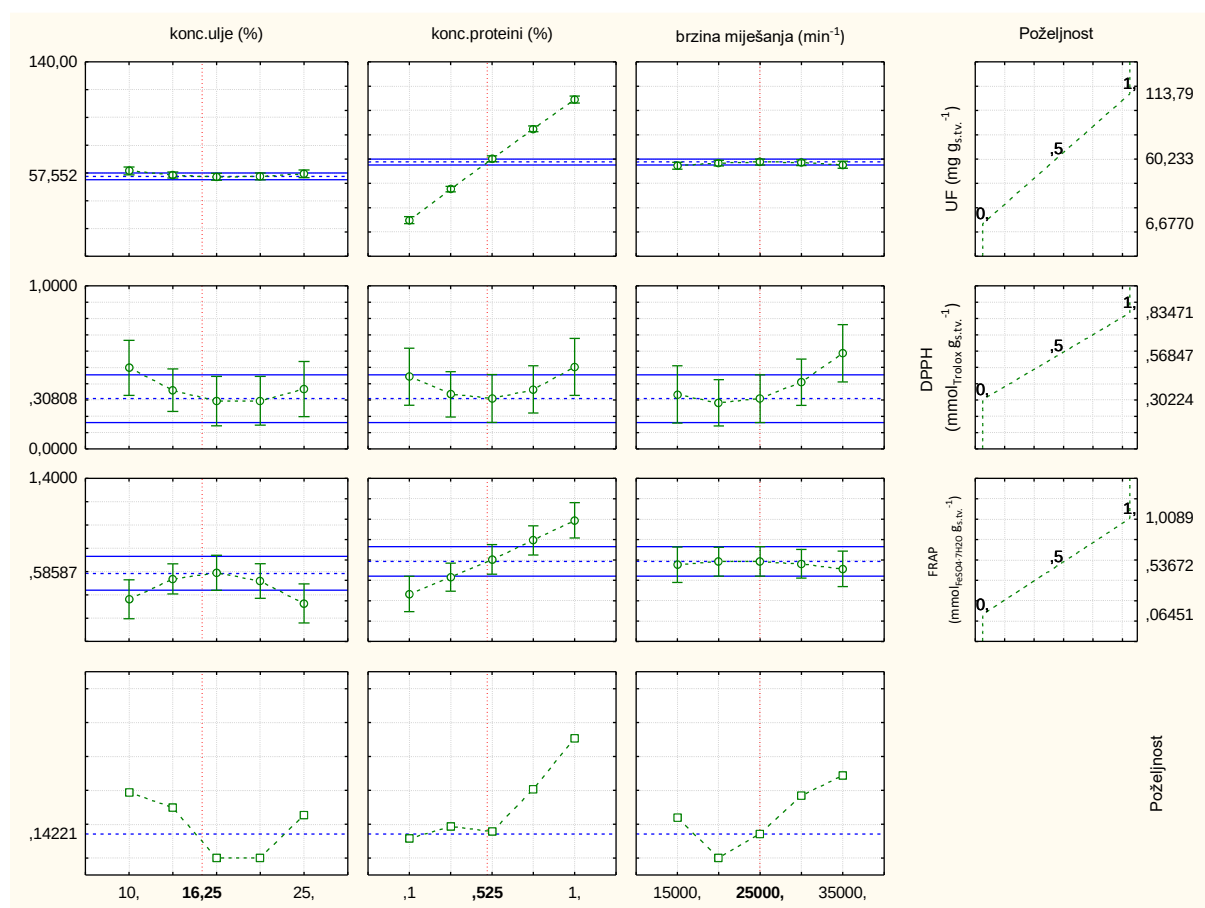
parametara procesa te procijenjene optimalne procesne parametre.

Na slici 6 vidljivo je da optimalna vrijednost za ukupne polifenole (UF) iznosi $UF = 18,59 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$ dok modelom predviđena vrijednost iznosi $UF = 27,64 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$. Povećanjem udjela ulja u emulziji s vodenim ekstraktom ružmarina vrijednost UF se ne mijenja dok povećanjem koncentracije emulgatora i brzine miješanja vrijednost UF raste.

Što se antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom tiče, optimalna vrijednost iznosi $DPPH = 0,2 \text{ mmol}_{Trolox} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$ dok modelom predviđena vrijednost također iznosi $DPPH = 0,2 \text{ mmol}_{Trolox} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$. Povećanjem udjela ulja u emulziji s vodenim ekstraktom ružmarina te brzine miješanja DPPH vrijednost se ne mijenja dok povećanjem koncentracije emulgatora antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom raste.

Optimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom iznosi $FRAP = 0,37 \text{ mmol}_{FeSO4 \cdot 7H2O} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$ dok modelom predviđena vrijednost iznosi $FRAP = 0,31 \text{ mmol}_{FeSO4 \cdot 7H2O} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$. Povećanjem udjela ulja u emulziji s vodenim ekstraktom ružmarina te brzine miješanja antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom se smanjuje dok porastom koncentracije komercijalnog proteina graška, kao emulgatora, raste.

Izračunati optimalni parametri procesa emulgiranja, za emulgirani ekstrakt ružmarina, iznose: brzina miješanja = 25000 rpm, udio uljne faze 16,17 %, koncentracija emulgatora 0,52 %.



Slika 7. Rezultati optimiranja uvjeta emulgiranja s obzirom na kemijska svojstva (UF, DPPH, FRAP) određena u pripremljenim emulzijama ulje u vodenom ekstraktu origana, uz dodatak komercijalnog proteina graška, kao emulgatora

Što se tiče emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana (slika 7), optimalna vrijednost UF iznosi $UF = 57,55 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$ dok modelom predviđena vrijednost iznosi $UF = 60,23 \text{ mg g}_{s.tv.}^{-1}$. Povećanje udjela uljne faze i brzine miješanja nema značajan utjecaj na porast UF dok povećanjem koncentracije emulgatora vrijednost UF značajno raste.

Optimalna antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom iznosi $DPPH = 0,31 \text{ mmol}_{Trolox} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$ dok je modelom predviđena vrijednost nešto viša te iznosi $DPPH = 0,57 \text{ mmol}_{Trolox} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$. Povećanjem vrijednosti ispitivanih parametara procesa povećat će se i DPPH vrijednost.

Optimalna antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom iznosi $FRAP = 0,58 \text{ mmol}_{FeSO_4 \cdot 7H_2O} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$ dok modelom predviđena vrijednost iznosi $FRAP = 0,54 \text{ mmol}_{FeSO_4 \cdot 7H_2O} \text{ g}_{s.tv.}^{-1}$. Povećanjem udjela uljne faze i brzine miješanja vrijednost FRAP-a se smanjuje dok povećanjem koncentracije emulgatora FRAP vrijednost značajno raste.

Izračunati optimalni parametri procesa emulgiranja, za emulgirani ekstrakt origana, iznose: brzina miješanja = 25000 rpm, udio uljne faze 16,25 %, koncentracija emulgatora 0,52 %.

Chong i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojem su koristili metodu odzivnih površina kako bi optimirali procesne parametre pripreme nanoemulzije palminog ulja bogatog tokoferolom stabilizirane s komercijalnim emulgatorima (Tween 80, Span 80). Ispitivan je utjecaj tri nezavisne varijable (koncentracije surfaktanta, udjela otapala i tlak homogenizacije) na dvije zavisne varijable: veličinu čestica i indeks polidisperznosti. Za dizajn eksperimenta odabran je centralni kompozitni dizajn te je provedeno ukupno 20 eksperimenata. Optimalna formulacija nanoemulzije sastojala se od 6,09 % (w/w) surfaktanta, 20 % otapala te homogenizacije pod tlakom od 500 bara. Modelom predviđena vrijednost veličine čestica iznosila je 111,93 nm dok je eksperimentalna vrijednost iznosila 119,49 nm. Također, modelom predviđena vrijednost indeksa polidisperznosti iznosila je 0,24, a eksperimentalno dobivena 0,29. Autori su zaključili kako se dobivene vrijednosti dobro slažu s modelom predviđenim vrijednostima te su potvrdili uspješnost optimiranja procesa emulgiranja metodom odzivnih površina.

Također, Mehmood i sur. (2017) proveli su istraživanje s ciljem proizvodnje nanoemulzije maslinovog ulja na bazi α – tokoferola, stabiliziranu s neionskim surfaktantom. Za pripremu emulzije, kao disperzna faza korišteno je maslinovo ulje sa α – tokoferolom, deionizirana voda kao kontinuirana, a kao emulgator upotrijebljen je Tween 80. Brzina miješanja iznosila je 15000 rpm. U istraživanju je korištena RSM metoda kako bi se odredio utjecaj nezavisnih varijabli (vrijeme homogenizacije, udio uljne faze, koncentracija emulgatora) na prosječnu veličinu čestica, p-anisidin vrijednost te antioksidacijsku aktivnost određivanu Pavia-Martinis i Gordnom metodom. Korišten je centralni kompozitni dizajn zajedno s kvadratnim modelom te je provedeno ukupno 20 eksperimenata. Dobiveni optimalni parametri procesa emulgiranja iznosili su: vrijeme emulgiranja = 3 min, udio uljne faze 4 %, koncentracija emulgatora 2,8 %. Modelom predviđene vrijednosti iznosile su: za veličinu čestica 151,68 nm, za p-anisidin vrijednost 7,17 % i za antioksidacijsku aktivnost 88,64 %. S druge strane eksperimentalno dobivene vrijednosti iznosile su 146,23 nm za veličinu čestica, 8,33% p-anisidin vrijednost te 90,63 % za antioksidacijsku aktivnost iz čega su autori zaključili kako se prediktivni model može smatrati primjenjivim. Također, statističkom obradom (ANOVA) dobiveni su koeficijenti determinancije 0,98 za veličinu čestica, 0,97 za p-anisidin vrijednost te 0,98 za antioksidacijsku aktivnost što potvrđuje primjenjivost modela. Uz to, autori su u svom radu pokazali kako s povećanjem koncentracije ulja i koncentracije emulgatora raste i antioksidacijska aktivnost pripremljene emulzije.

4.4. ANALIZA VARIJANCE (ANOVA)

Primijenjena je analiza varijance (ANOVA) s ciljem ispitivanja utjecaja ulaznih varijabli odn. parametara procesa emulgiranja (koncentracija ulja, koncentracija emulgatora, brzina miješanja) na izlazne varijable (UF, DPPH, FRAP). Rezultati su prikazani u tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenata za kemijska svojstva emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina, uz dodatak komercijalnog proteina graška, kao emulgatora

Analizirano svojstvo	Parametar	Odsječak± standardna pogreška	Regresijski koeficijenti (L-linear, Q-kvadratni) ± standardna pogreška	P	R ²	R ² _{adj.}
UF (mg g _{s.tv.} ⁻¹)	konc. ulje (%)	27,647±2,355	-3,809±1,725 (L) -2,232±1,223 (Q)	0,052 (L) 0,098 (Q)	0,94	0,90
	konc. proteini (%)		19,197±2,644 (L) 0,623±2,147 (Q)	0,000 (L) 0,778 (Q)		
	brzina miješanja (rpm)		-2,595±1,725(L) -4,564±1,189(Q)	0,163(L) 0,003(Q)		
DPPH (mmol _{Trolox} g _{s.tv.} ⁻¹)	konc. ulje (%)	0,205±0,043	0,006± 0,032 (L) 0,002±0,022 (Q)	0,857 (L) 0,932 (Q)	0,35	0,00
	konc. proteini (%)		0,075±0,048 (L) -0,003±0,039 (Q)	0,155 (L) 0,940 (Q)		
	brzina miješanja (rpm)		0,01±0,032 (L) 0,002±0,022(Q)	0,766 (L) 0,908 (Q)		
FRAP (mmol _{FeSO₄·7H₂O} g _{s.tv.} ⁻¹)	konc. ulje (%)	0,142±0,041	-0,041±0,030 (L) 0,030±0,021(Q)	0,199 (L) 0,187 (Q)	0,76	0,62
	konc. proteini (%)		0,045±0,046 (L) 0,056±0,037 (Q)	0,354 (L) 0,165 (Q)		
	brzina miješanja (rpm)		-0,0008±0,030 (L) 0,074±0,021 (Q)	0,979 (L) 0,005(Q)		

Rezultati iz tablice 4 pokazuju da koncentracija proteina (%) te brzina miješanja (rpm) imaju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na udio ukupnih polifenola (UF) u emulzijama ulje u vodenom ekstraktu ružmarina sa dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora. Porastom koncentracije proteina dolazi do porasta vrijednosti UF u emulgiranim ekstraktima ružmarina dok povećanjem brzine miješanja udio UF se smanjuje. Udio ukupnih polifenola ne ovisi o koncentraciji ulja u emulgiranim ekstraktima ružmarina. Na temelju koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,94$ odn. $R^2_{adj.} = 0,90$) utvrđeno je da predikcijski modeli odlično opisuju eksperimentalne vrijednosti UF u emulgiranim ekstraktima ružmarina ovisno o promatranim parametrima procesa emulgiranja.

Što se antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom tiče, primijenjeni modeli ne opisuju dobro utjecaj koncentracije ulja, koncentracije proteina i brzine miješanja na DPPH vrijednost emulgiranih ekstrakata ružmarina ($R^2 = 0,35$ odn. $R^2_{adj.} = 0,00$). Ispitivani parametri procesa emulgiranja ne pokazuju statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$) na eksperimentalno dobivene DPPH vrijednosti.

Što se tiče antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, brzina miješanja ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na FRAP vrijednosti emulgiranih ekstrakata ružmarina, za razliku od koncentracije emulgatora i brzine miješanja ($p > 0,05$). Nadalje, na temelju koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,76$ odn. $R^2_{adj.} = 0,62$) vidljivo je da predikcijski modeli dobro opisuju eksperimentalne FRAP vrijednosti emulgiranih ekstrakata ružmarina ovisno o promatranim parametrima procesa emulgiranja.

Tablica 5. Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenata za kemijska svojstva emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana, uz dodatak komercijalnog proteina graška, kao emulgatora

Analizirano svojstvo	Parametar	Odsječak ± standardna pogreška	Regresijski koeficijenti (L-linearni, Q-kvadratni) ± standardna pogreška	P	R^2	$R^2_{adj.}$
UF (mg g _{s.tv.} ⁻¹)	konc. ulje (%)	59,375 ± 0,978	-1,043 ± 0,708 (L) -1,408 ± 0,515 (Q)	0,175 (L) 0,023 (Q)	0,99	0,99
	konc. proteini (%)		48,826 ± 1,104 (L) 0,800 ± 0,905 (Q)	0,000 (L) 0,399 (Q)		
	brzina miješanja (rpm)		0,38254 ± 0,708542 (L) 1,304 ± 0,501 (Q)	0,60 (L) 0,029 (Q)		
DPPH (mmol Trolox g _{s.tv.} ⁻¹)	konc. ulje (%)	0,706 ± 0,059	-0,065 ± 0,043 (L) -0,062 ± 0,031 (Q)	0,164 (L) 0,079 (Q)	0,76	0,60
	konc. proteini (%)		0,176 ± 0,067 (L) -0,145 ± 0,055 (Q)	0,028 (L) 0,026 (Q)		
	brzina miješanja (rpm)		0,126 ± 0,043 (L) -0,076 ± 0,030 (Q)	0,016 (L) 0,033 (Q)		
FRAP (mmol FeSO ₄ · 7H ₂ O g _{s.tv.} ⁻¹)	konc. ulje (%)	0,430 ± 0,059	-0,018 ± 0,043 (L) 0,109 ± 0,031 (Q)	0,687 (L) 0,006 (Q)	0,91	0,84
	konc. proteini (%)		0,380 ± 0,066 (L) -0,019 ± 0,054 (Q)	0,0003 (L) 0,731 (Q)		
	brzina miješanja (rpm)		-0,020 ± 0,043 (L) 0,027 ± 0,030 (Q)	0,644 (L) 0,400 (Q)		

Što se emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana tiče, koncentracija ulja u emulziji, koncentracija emulgatora te brzina miješanja pokazuju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na vrijednosti UF-a izmjerenih u emulgiranim ekstraktima (tablica 5). Povećanjem koncentracije

komercijalnog proteina graška u emulziji, značajno rastu vrijednosti udjela ukupnih polifenola. Na temelju izračunatog koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,99$ odn. $R^2_{adj.} = 0,99$) vidljivo je da predikcijski modeli odlično opisuju eksperimentalne vrijednosti UF u emulgiranim ekstraktima origana ovisno o promatranim parametrima procesa emulgiranja.

Koncentracija proteina u emulgiranim ekstraktima origana te brzina miješanja značajno utječu na eksperimentom dobivene DPPH vrijednosti ($p < 0,05$), za razliku od koncentracije ulja ($p > 0,05$). Pozitivne vrijednosti njihovih linearnih regresijskih koeficijenata ukazuju kako povećanjem brzine miješanja i koncentracije emulgatora DPPH vrijednosti rastu. Vrijednost koeficijenta determinacije za antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom iznosi 0,76 ($R^2_{adj.} = 0,60$) ukazujući da postoji čvrsta veza između DPPH vrijednosti emulgiranih ekstrakata origana i promatranih parametara procesa emulgiranja.

Što se antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom tiče, statistički značajn utjecaj pokazuju koncentracija ulja i emulgatora u emulgiranim ekstraktima origana ($p < 0,05$), za razliku od brzine miješanja ($p > 0,05$). Koncentracija komercijalnog proteina graška kao emulgatora pokazuje linearnu ovisnost; porastom koncentracije emulgatora, FRAP vrijednosti linearno rastu. Vrijednost koeficijenta determinacije za antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom iznosi 0,91 ($R^2_{adj.} = 0,84$) ukazujući da postoji čvrsta veza između FRAP vrijednosti emulgiranih ekstrakata origana i promatranih parametara procesa emulgiranja, odn. predikcijski modeli odlično opisuju eksperimentalne FRAP vrijednosti emulgiranih ekstrakata origana.

Karadag i sur. (2013) proveli su istraživanje s ciljem pripreme nanoemulzije kvercetina u vodi s neionskim prehrambenim emulgatorima (Tween 80 i Span 20, pomiješani u omjeru 1:1) primjenom homogenizacije pod visokim tlakom. Ispitali su utjecaj koncentracije uljne faze (10-20 %), koncentracije emulgatora (5-15 %) i tlaka homogenizacije (52-187 MPa) na veličinu čestica i stabilnost emulzije s ciljem optimizacije koncentracije emulgatora i uljne faze pomoću metode odzivnih površina. Također je korišten model linearne regresije za predikciju veličine čestica i stabilnosti emulzije. Primjenjivost modela ocijenjena je analizom varijance (ANOVA). Na temelju dobivenih koeficijenata determinacije ($R^2 = 0,97$ za veličinu čestica i $R^2 = 0,78$ za stabilnost emulzije), autori su zaključili da predikcijski modeli uspješno opisuju eksperimentalne vrijednosti veličine čestica i stabilnosti emulzije.

4.5. ODREĐIVANJE PROSJEČNOG FERETOVOG PROMJERA KAPLJICA U EMULZIJAMA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU RUŽMARINA I ORIGANA S DODATKOM EMULGATORA

Osim što su svakoj pripremljenoj emulziji ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana određena fizikalna i kemijska svojstva, određena im je i veličina kapljica mjerenjem prosječnog Feretovog promjera. Veličina kapljica emulzije važna je značajka koja utječe na stabilnost emulzija jer što su kapljice emulzije, odnosno njihov promjer, manji to je emulzija stabilnija jer su emulzije s manjim kapljicama otporne na gravitacijsko odvajanje (Katsouli i sur. 2018).

Općenito, emulzije se mogu klasificirati u dvije kategorije: emulzije i mikroemulzije koje prelaze jedna u drugu promjenom veličine čestica (Goodarzi i Zendehboudi, 2018).

U ovom radu mjerenjima su dobivene kapljice kružnog oblika te im je veličina određivana pomoću računalnog programa ImageJ. ImageJ je softverski alat koji se koristi u različitim područjima znanosti poput biologije, medicine, astronomije i mikroskopije. Jednostavno, ali dobro uređeno grafičko sučelje može se koristiti za osnovno ali i napredno analiziranje slika, a kao izlazne parametre najčešće prikazuje površinu, opseg, broj čestica, minimalne i maksimalne vrijednosti osi i Feretov promjer (Van de Linde, 2019).

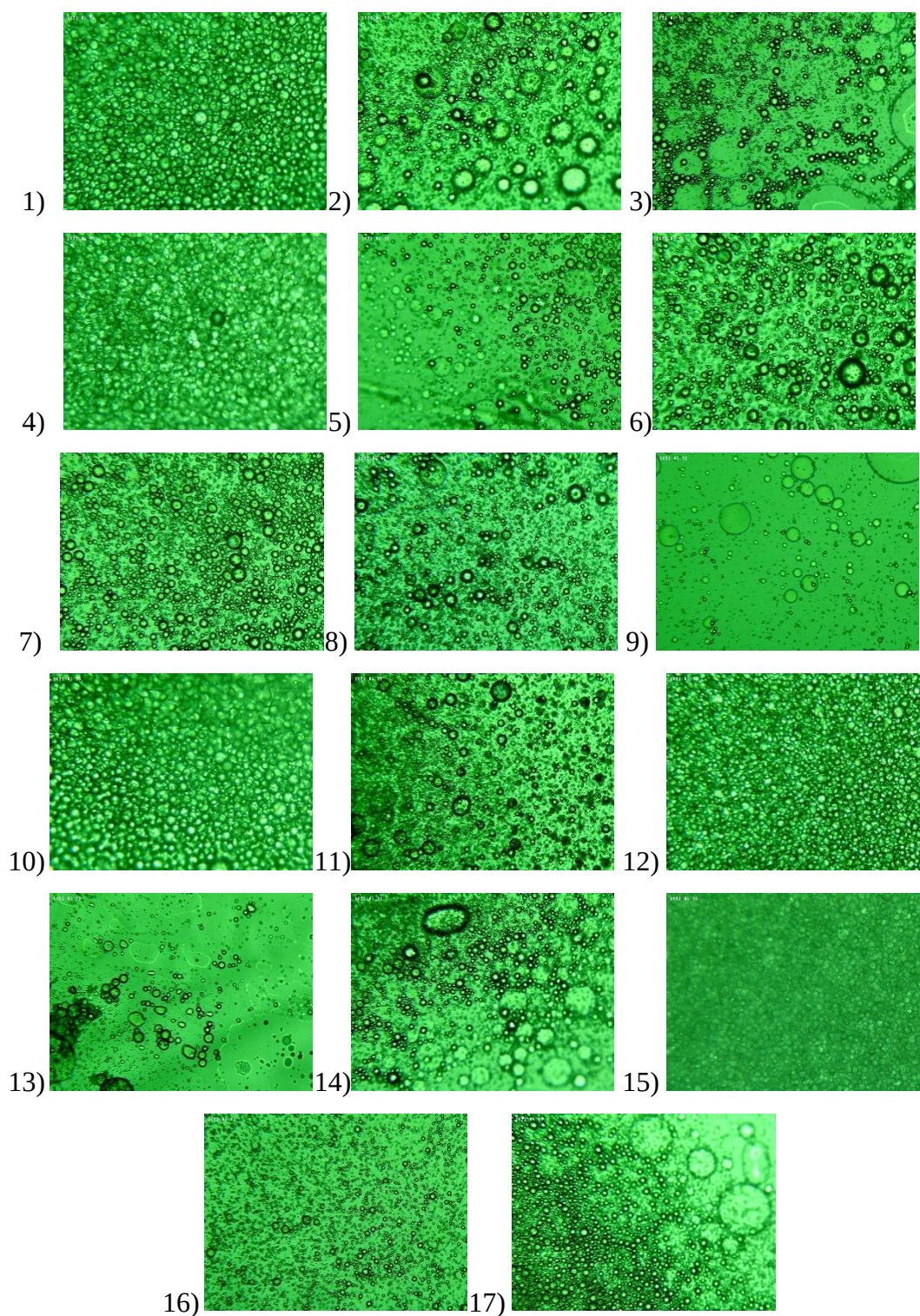
Odmah nakon završetka emulgiranja, fotografirani su mikroskopski prikazi slika s trenutnim stanjem kapljica emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina i origana uz dodatak komercijalnog proteina graška kao emulgatora. Na slikama 8 i 9 prikazane su fotografije slika s trenutnim stanjem kapljica emulzije dok slika 10 prikazuje usporedbu prosječnog Feretovog promjera o vrsti biljke pri različitim eksperimentalnim uvjetima za emulzije ulja u vodenim biljnim ekstraktima s dodatkom emulgatora.

Najveću vrijednost prosječnog Feretovog promjera (97,97 μm) pokazao je uzorak pod brojem 9 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 0,1 %) odn. emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana. Najnižu vrijednost prosječnog Feretovog promjera za emulzije ulja u vodenom ekstraktu origana pokazuje uzorak koji je pripreman pod eksperimentalnim uvjetima broj 7 (brzina miješanja 35000 rpm, udio uljne faze 10 %, koncentracija emulgatora 0,5 %) (slika 10). Za uzorke emulzija ulje u vodenim ekstraktima origana najniže vrijednosti prosječnog Feretovog promjera dobivene su za 1 %-tnu koncentraciju emulgatora, a najviše kod primjene 0,1 %-tne koncentracije emulgatora što je u skladu s istraživanjem Karadaga i sur. (2013) u kojem navode kako se povećanjem koncentracije emulgatora, smanjuje veličina kapljica emulzija.

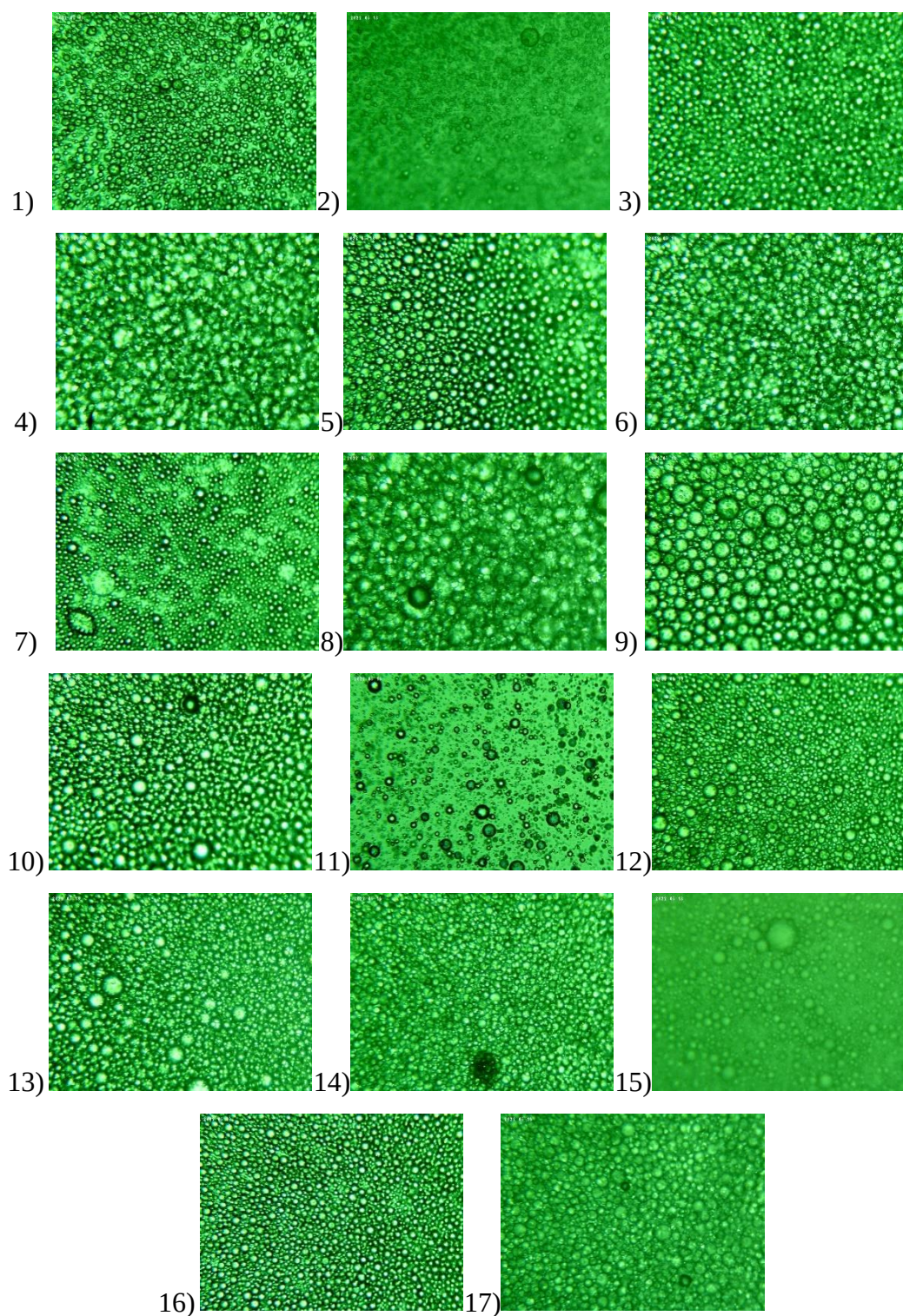
Što se emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina tiče, najnižu vrijednost prosječnog

Feretovog promjera ($25,73\ \mu\text{m}$) pokazuje uzorak pripreman pod eksperimentalnim uvjetima broj 9 (brzina miješanja 15000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 0,1 %) dok uzorak pripreman pod eksperimentalnim uvjetima broj 10 (brzina miješanja 10000 rpm, udio uljne faze 15 %, koncentracija emulgatora 1 %) ima najvišu vrijednost prosječnog Feretovog promjera koja iznosi $57,96\ \mu\text{m}$. Za uzorke emulzija ulje u vodenim ekstraktima ružmarina najniže vrijednosti prosječnog Feretovog promjera dobivene su za 0,1 %-tnu koncentraciju emulgatora a najviše za 0,5 %-tnu koncentraciju emulgatora.

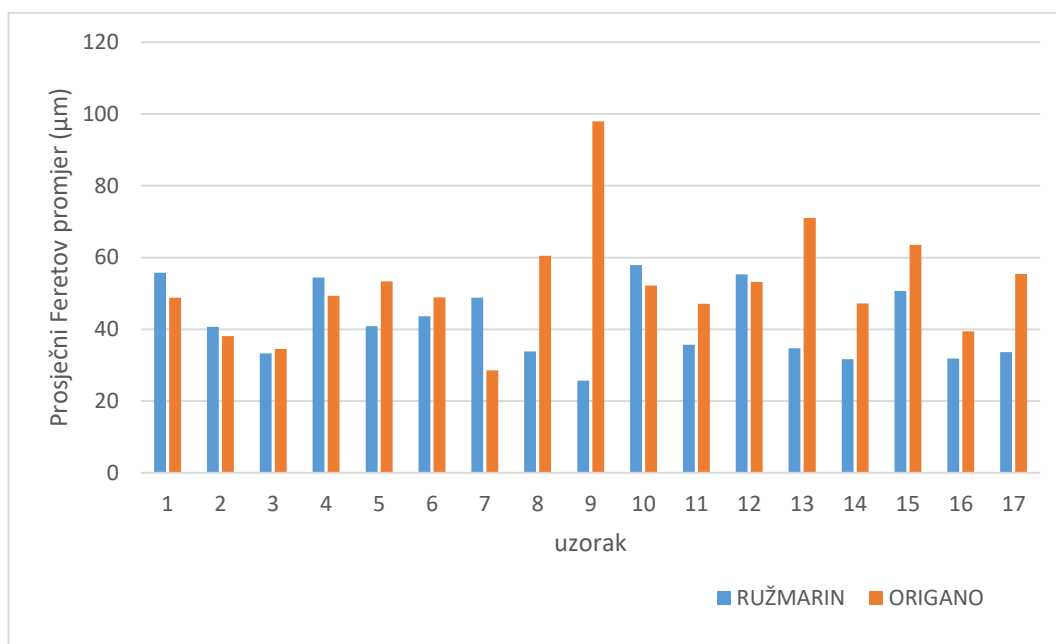
Generalno gledajući, emulzije ulja u vodenim ekstraktima origana imaju nešto više vrijednosti prosječnog Feretovog promjera u odnosu na emulzije ulja u vodenim ekstraktima ružmarina što se može vidjeti i analizom slika 8 i 9.



Slika 8. Mikroskopski prikaz kapljica emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora, pri različitim eksperimentalnim uvjetima (pokusi 1-17)



Slika 9. Mikroskopski prikaz kapljica emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora, pri različitim eksperimentalnim uvjetima (pokusi 1-17)



Slika 10. Usporedba ovisnosti prosječnog Feretovog promjera o vrsti biljke pri različitim eksperimentalnim uvjetima za emulzije ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora

4.6. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA I EMULZIJA ULJE U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA NAKON *IN VITRO* PROBAVE

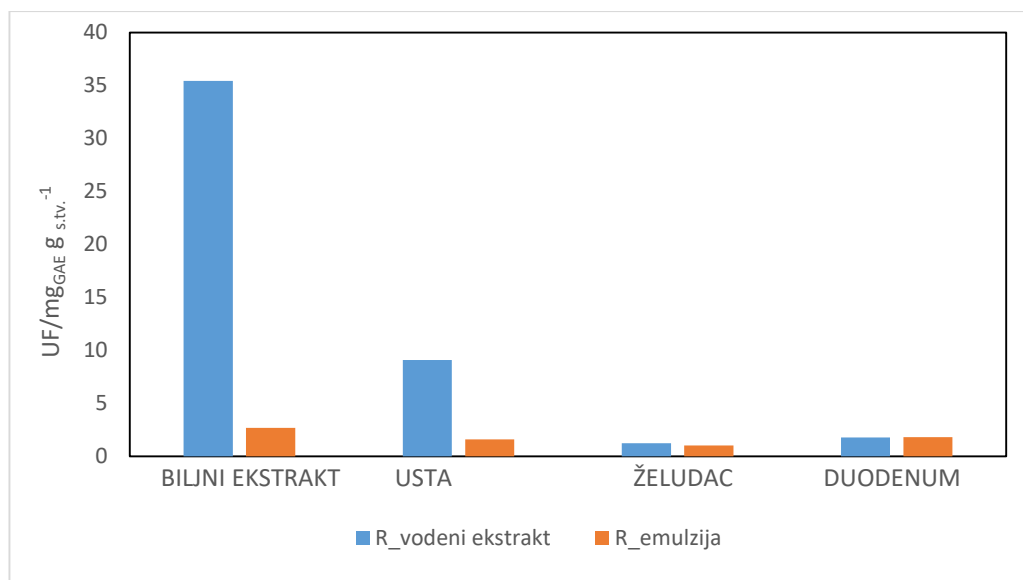
Nakon što su određeni optimalni uvjeti za pripremu emulzija (brzina miješanja: 25000 rpm, udio uljne faze 16,17 %, koncentracija emulgatora 0,52 % za emulgirani ekstrakt ružmarina, odn. brzina miješanja: 25000 rpm, udio uljne faze 16,25 %, koncentracija emulgatora 0,52 % za emulgirani ekstrakt origana), pod tim uvjetima pripremljene su emulzije ulja u vodenim ekstraktima ružmarina i origana s dodatkom komercijalnog proteina graška. Tako pripremljene emulzije, zajedno sa biljnim ekstraktima ružmarina i origana korištene su za provođenje *in vitro* probave. Nakon *in vitro* simulacije probavnog sustava, uzorcima su određena fizikalna (TDS, vodljivost) i kemijska svojstva (ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodama) te su rezultati prikazani u tablici 6, odn. na slikama 11-16. Nulte koncentracije su rezultati dobiveni fizikalno-kemijskom analizom uzoraka (vodenih ekstrakata ili emulzija) prije početka *in vitro* simulacije probavnog sustava.

Tablica 6. Fizikalna svojstva biljnih ekstrakata i emulzija ulje u vodenim biljnim ekstraktima s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora prije i tijekom *in vitro* simulacije probavnog sustava

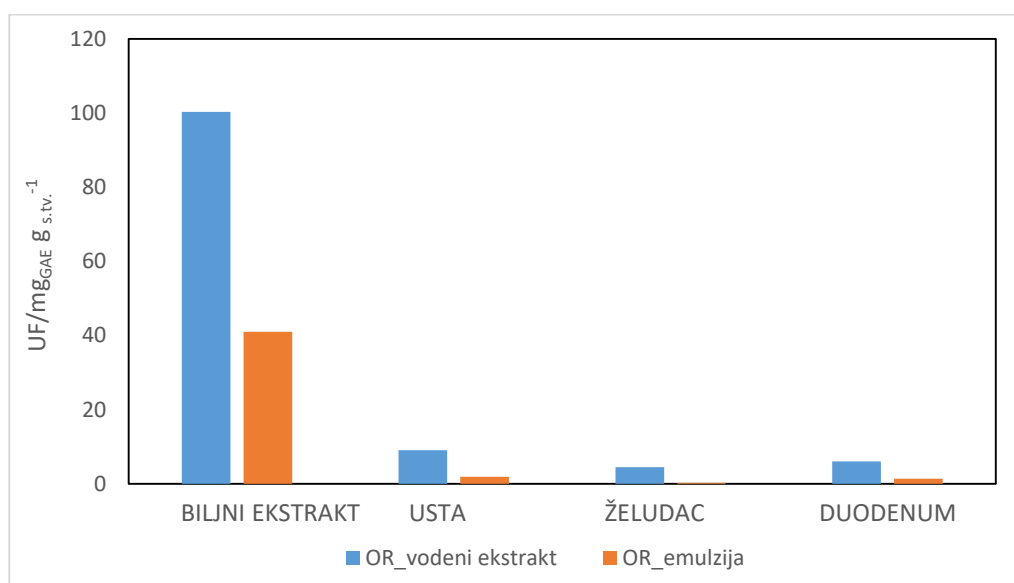
	RUŽMARIN		ORIGANO	
	TDS (g L ⁻¹)	VODLJIVOST (mS cm ⁻¹)	TDS (g L ⁻¹)	VODLJIVOST (mS cm ⁻¹)
BILJNI EKSTRAKT	0,09±0,00	0,18±0,00	0,31±0,01	0,63±0,00
BILJNI EKSTRAKT: USTA	2,46±0,02	4,93±0,03	2,42±0,06	4,90±0,08
BILJNI EKSTRAKT: ŽELUDAC	1,25±0,004	2,50±0,01	1,35±0,02	2,61±0,15
BILJNI EKSTRAKT: DUODENUM	4,28±0,04	8,39±0,21	4,88±0,05	9,80±0,06
EMULZIJA	0,02 ±0,00	0,04±0,00	0,004 ±0,00	0,01±0,00
EMULZIJA: USTA	1,18±0,03	2,39±0,02	2,36±0,15	4,92±0,08
EMULZIJA: ŽELUDAC	1,61±0,04	3,24±0,06	1,23±0,01	2,46±0,01
EMULZIJA: DUODENUM	4,69±0,08	9,48±0,06	4,93±0,00	9,85±0,04

Električna vodljivost je mjera koliko lako električna struja može proći kroz vodu, neku drugu otopinu ili suspenziju i pod utjecajem je prisutnih elektrolita, pH i temperature (Jurinjak Tušek i sur., 2020). Početne vrijednosti vodljivosti i TDS-a više su za biljne ekstrakte u odnosu na emulgirane (Tablica 6). Nakon provedenog postupka *in vitro* simulacije probavnog sustava dolazi do povećanja vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari u odnosu na početne vrijednosti (prije *in vitro* probave) što je bilo i za očekivati zbog dodatka probavnih enzima, žučnih soli i klorovodične kiseline (tablica 6). Najveće vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari izmjerene su za duodenum za sve uzorke što je u skladu s istraživanjem koje je provela Đurđević (2020). Također, uočeno je kako su vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari nešto više za emulgirane biljne ekstrakte u odnosu na vodene ekstrakte ružmarina i origana, nakon završene *in vitro* probave. Najveću vrijednost vodljivosti pokazuje emulzija ulja u vodenom ekstraktu origana pripremljena pod optimalnim uvjetima nakon završene probave u duodenumu (9,85±0,04 mS cm⁻¹).

Vidljivo je kako postoji pozitivna korelacija između vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (tablica 6) sa vrijednostima ukupnih polifenola (slika 11) jer su najviše početne vrijednosti vodljivosti i TDS-a te ukupnih polifenola (slika 11) izmjerene za vodeni ekstrakt origana što je u skladu s istraživanjem Đurđević (2020).



Slika 11. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih fenola (UF) za vodeni ekstrakt ružmarina (R_vodeni ekstrakt) i emulzije ulje u vodenom ekstraktu ružmarina s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora (R_emulzija) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 12. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih polifenola (UF) za vodeni ekstrakt origana (OR_vodeni ekstrakt) i emulzije ulje u vodenom ekstraktu origana s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora (R_emulzija), nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

Na slikama 11 i 12 vidljivo je kako su koncentracije ukupnih polifenola više kod vodenih ekstrakta ružmarina i origana u odnosu na emulzije pripremljene pod optimalnim uvjetima. Biljni ekstrakt origana pokazuje najvišu početnu (nultu) vrijednost UF ($100,27 \pm 7,71 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) u odnosu na biljni ekstrakt ružmarina ($35,00 \pm 0,19 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana ima višu početnu (nultu) koncentraciju UF ($40,95 \pm 5,19 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) u odnosu na emulziju ulje u vodenom ekstraktu ružmarina ($2,70 \pm 0,00 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) što je bilo i za očekivati s obzirom da je koncentracija ukupnih polifenola u origanu bila viša i prije početka *in vitro* simulacije probavnog sustava. Tako dobiveni rezultati razlikuju se od rezultata koje su dobili Suk Kim i sur. (2012). Oni su analizirali vodene ekstrakte 13 najčešće korištenih biljaka za procesiranje hrane kako bi utvrdili koji ekstrakti sadrže najviše količine ukupnih fenola te najveću antioksidacijsku aktivnost. Njihovi rezultati su pokazali kako čisti ekstrakti ružmarina sadrže veće količine ukupnih fenola u odnosu na čisti ekstrakt origana.

Vrijednosti UF nakon završenog prvog koraka *in vitro* probave (usta) značajno su niže u uzorcima biljnih ekstrakata (slika 11 i 12) kao i u emulgiranim ekstraktima origana (slika 12). Od biljnih ekstrakata, najveći pad koncentracije UF uočen je kod origana ($9,04 \pm 1,22 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), u odnosu na ružmarin ($9,11 \pm 6,33 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Što se emulzija tiče, najveći pad koncentracije UF u ustima dobiven je za emulziju ulja u vodenom ekstraktu origana ($1,92 \pm 0,20 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) (slika 12) u odnosu na emulziju ulje u vodenom ekstraktu ružmarina ($1,62 \pm 1,37 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) (slika 11).

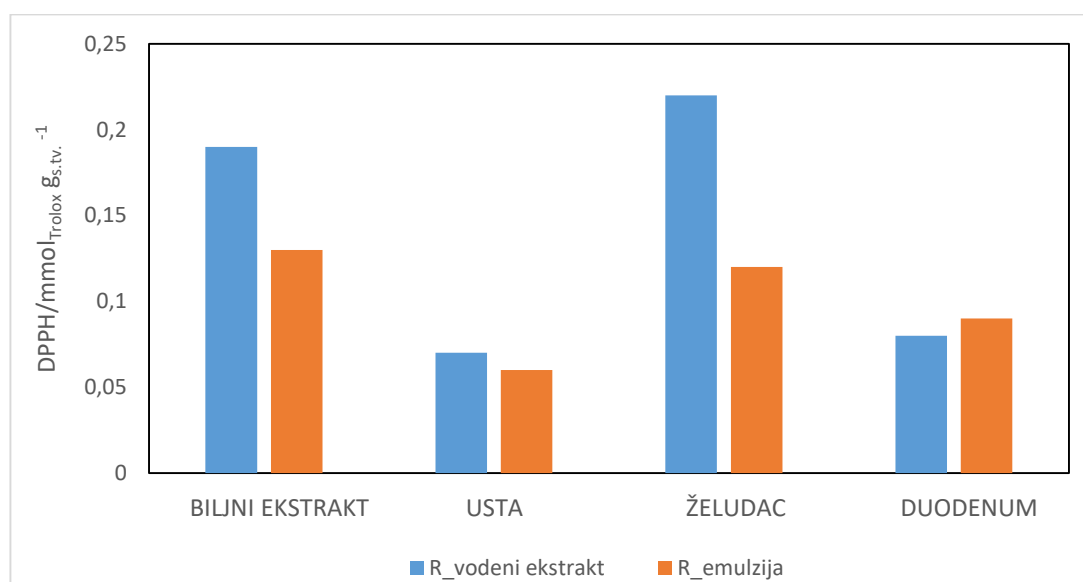
Vrijednosti UF nakon završenog drugog koraka *in vitro* probave (želudac) pokazuju padajući trend u uzorcima biljnih ekstrakata ružmarina i origana (slike 11 i 12). Što se emulzija tiče, padajući trend je također prisutan; značajan je za emulziju ulje u vodenom ekstraktu origana ($0,25 \pm 0,04 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) u odnosu na emulziju ulje u vodenom ekstraktu ružmarina ($1,05 \pm 0,72 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) (slike 11 i 12).

Vrijednosti UF nakon završenog trećeg koraka *in vitro* probave (duodenum) nešto su više za sve promatrane uzorke, u odnosu na vrijednosti UF u želucu (slike 11 i 12). Tarko i Duda-Chodak (2020) u svom istraživanju također navode povećanje udjela polifenola i antioksidacijske aktivnosti nakon završenog procesa probave u duodenumu što objašnjavaju na

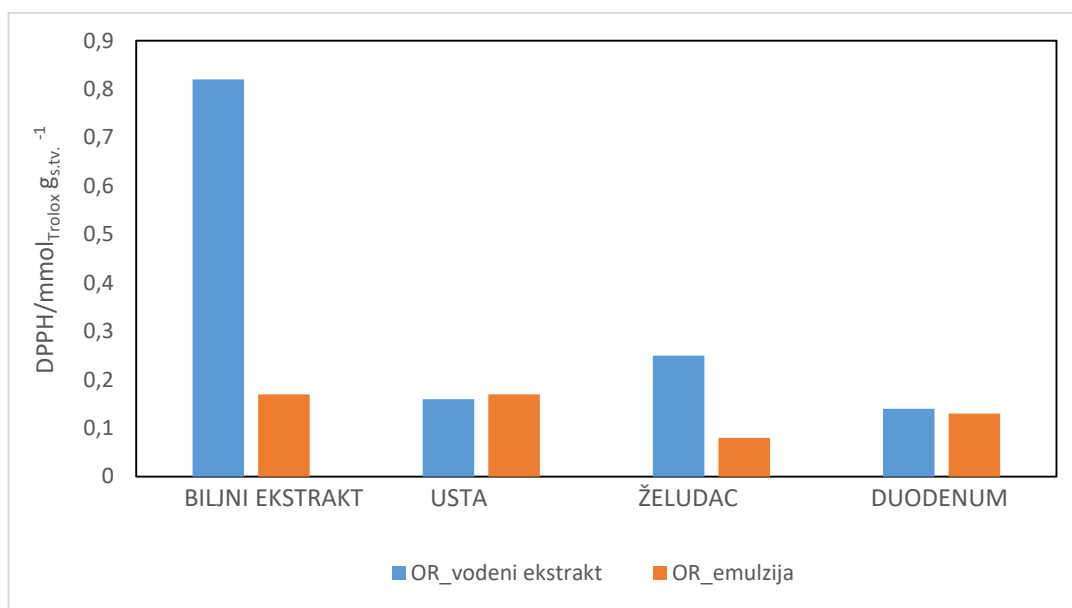
način da promjene pH u želucu i duodenumu te aktivnost probavnih enzima u duodenumu dovode do nastajanja spojeva s povećanom antioksidacijskom aktivnošću.

Najviša UF vrijednost izmjerena je za vodeni ekstrakt origana ($6,01 \pm 0,55 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) dok je najmanja vrijednost izmjerena za emulziju ulje u vodenom ekstraktu origana ($1,39 \pm 0,24 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$).

Uspoređujući vrijednosti UF-a prije (početna odn. nulta koncentracija) te nakon završene *in vitro* probave (koncentracija UF u duodenumu) moguće je primijetiti da su najveći stupanj očuvanja ukupnih polifenola, od emulgiranih uzoraka, imali uzorci emulgirani s vodenim ekstraktom ružmarina (slika 11). Što se biljnih ekstrakata tiče, najveći stupanj očuvanja UF pokazali su biljni ekstrakti origana (slika 12).



Slika 13. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za vodeni ekstrakt ružmarina (R_vodeni ekstrakt) i emulzije ulje u vodenom ekstraktu ružmarina s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora (R_emulzija), nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 14. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za vodeni ekstrakt origana (OR_vodeni ekstrakt) i emulzije ulje u vodenom ekstraktu origana s dodatkom komercijalnog protein graška kao emulgatora (OR_origano) nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

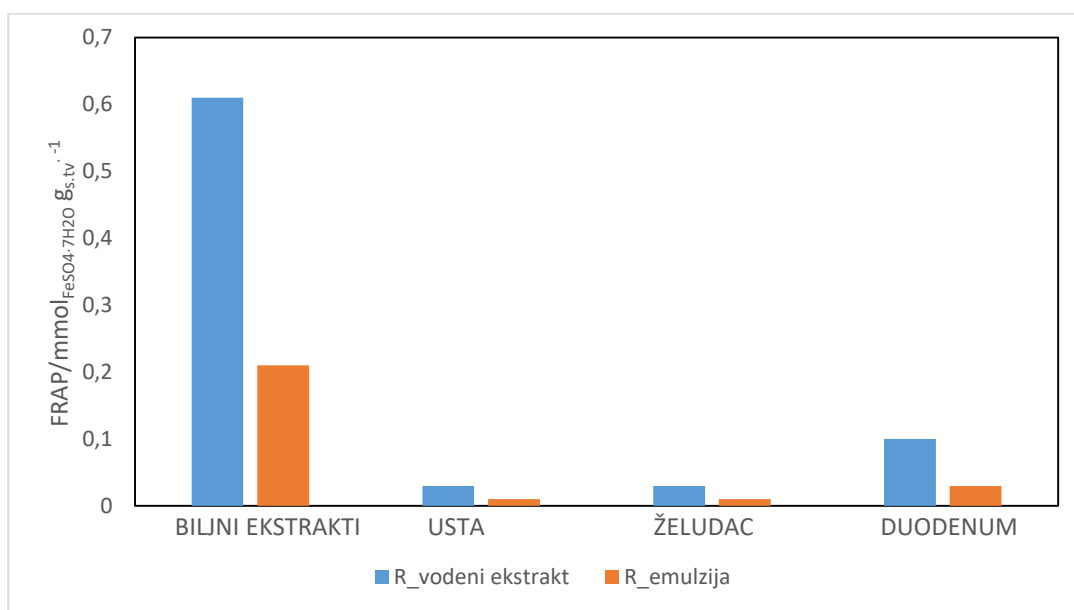
Rezultati dobiveni određivanjem antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom pokazuju kako vodeni ekstrakti origana i ružmarina imaju više vrijednosti nego emulzije pripremljene pod optimalnim uvjetima (slike 13 i 14). Također, rezultati pokazuju kako ekstrakt origana ima višu vrijednost antioksidacijske aktivnosti ($0,8208 \pm 0,06 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) u odnosu na ekstrakt ružmarina čija vrijednost iznosi $0,1921 \pm 0,01 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ što je bilo i očekivano s obzirom na viši udio UF.

Vrijednosti dobivene DPPH metodom pokazuju različite trendove. Nakon provedenog prvog koraka *in vitro* simulacije probavnog sustava (usta), dolazi do pada antioksidacijske aktivnosti za sve uzorke (slike 13 i 14). Najveći pad aktivnosti pokazuje ekstrakt origana ($0,82 \pm 0,03 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) dok emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana pripremljena pod optimalnim uvjetima nakon prvog koraka probave ima u potpunosti očuvanu antioksidacijsku aktivnost (u odnosu na početnu odn. nultu koncentraciju) i ona iznosi $0,17 \pm 0,01 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$.

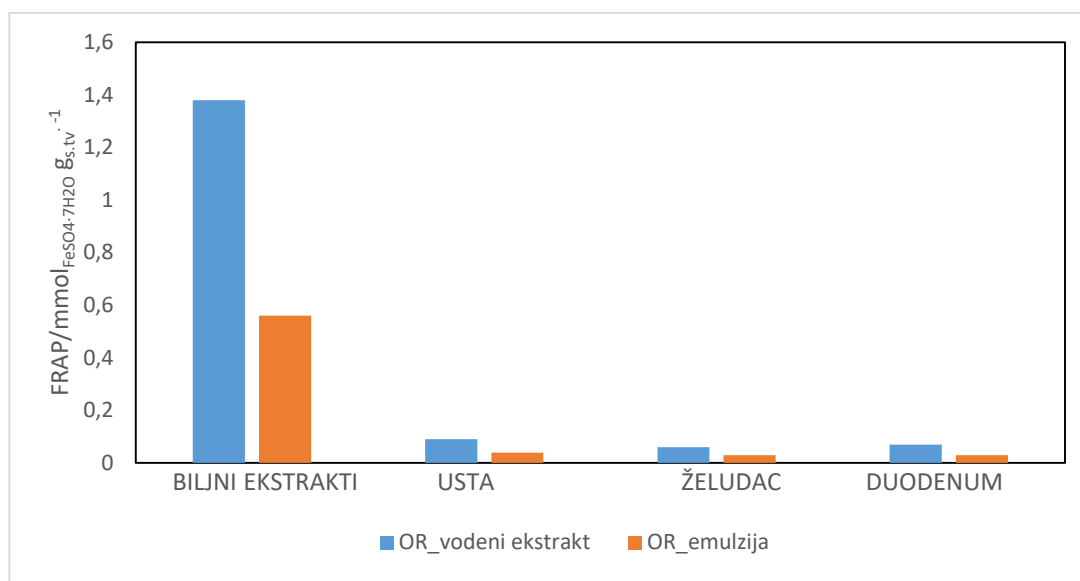
Nakon drugog koraka *in vitro* simulacije probavnog sustava (želudac) vidljiv je trend rasta vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za sve uzorke (slike 13 i 14) što je rezultat utjecaja pH vrijednosti te razlike u sposobnosti biljaka da reduciraju DPPH zbog različitih udjela bioaktivnih komponenti (Đurđević, 2020). Najveću DPPH vrijednost nakon simulacije probave u želucu ima tekući ekstrakt origana ($0,25 \pm 0,17 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$).

Nakon posljednjeg (trećeg) koraka *in vitro* simulacije probavnog sustava (duodenum), prisutan je padajući trend vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za sve uzorke s iznimkom emulzije ulja u vodenom ekstraktu origana pripremljenoj pod optimalnim uvjetima (slika 14).

Općenito gledajući, vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakta origana i emulzija ulja u vodenom ekstraktu origana više su u odnosu na ekstrakte ružmarina i emulzija ulja u vodenom ekstraktu ružmarina te je vidljivo kako emulzije pripremljene pri optimalnim uvjetima imaju bolje očuvanje DPPH vrijednosti u odnosu na čiste ekstrakte ružmarina i origana (slike 13 i 14).



Slika 15. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za vodeni ekstrakt ružmarina (R_vodeni ekstrakt) i emulzije ulje u vodenom ekstraktu ružmarina s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora (R_emulzija), nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava



Slika 16. Grafički prikaz promjene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za vodeni ekstrakt origana (OR_vodeni ekstrakt) i emulzije ulje u vodenom ekstraktu origana s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora (OR_emulzija), nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava

Rezultati dobiveni određivanjem antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom ne podudaraju se s vrijednostima antioksidacijske aktivnosti dobiveni DPPH metodom što je vjerojatno zbog različitih polifenolnih komponenti prisutnih u biljkama koje mogu utjecati na reduciranje pojedinih radikala (Đurđević, 2020).

Prije početka *in vitro* simulacije probavnog sustava najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti ima vodeni ekstrakt ružmarina ($1,38 \pm 0,02 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), dok najnižu vrijednost ima emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina pripremljena pod optimalnim uvjetima ($0,21 \pm 0,01 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) (slika 15). Kao i kod DPPH metode, dodatkom emulgatora (komercijalni protein graška) smanjuju se početne FRAP vrijednosti emulgiranih ekstrakata u odnosu na vodene ekstrakte.

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti nakon prvog koraka *in vitro* simulacije probavnog sustava (usta) kreću se u rasponu od $0,09 \pm 0,00 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ za tekući ekstrakt origana što je najviša vrijednost do $0,01 \pm 0,00 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ za emulziju ulja u vodenom ekstraktu ružmarina koji pokazuje najnižu vrijednost. Također i nakon drugog koraka (želudac), najveću vrijednost ima vodeni ekstrakt origana ($0,06 \pm 0,00 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), a najnižu emulzija ulje u vodenom ekstraktu ružmarina ($0,01 \pm 0,00 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Nakon *in vitro* simulacije probave u duodenumu, najvišu FRAP vrijednost ($0,10 \pm 0,00 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) pokazuje čisti ekstrakt ružmarina, dok emulzija ulje u vodenom ekstraktu origana

pokazuje najnižu vrijednost antioksidacijske aktivnosti ($0,03 \pm 0,00 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$).

Uspoređujući početne vrijednosti te vrijednosti nakon *in vitro* probave, najveće očuvanje antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom pokazuje emulzija ulja u vodenom ekstraktu ružmarina, dok najveći pad FRAP vrijednosti pokazuje vodeni ekstrakt ružmarina.

4.7. POSTOTAK PREŽIVLJAVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA S ANTIOKSIDACIJSKOM AKTIVNOŠĆU

Nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava određena je i uspoređena biodostupnost ukupnih polifenola iz vodenih biljnih ekstrakata te emulzija ulje u vodenim biljnim ekstraktima pripremljenim pri optimalnim uvjetima. Biodostupnost je određena kao omjer ukupnih polifenola (UF) te antioksidacijske aktivnosti (DPPH, FRAP) nakon završetka *in vitro* probave (duodenum) i početne (nulte) koncentracije (prije početka *in vitro* probave).

Tablica 7. Biodostupnost polifenolnih spojeva u biljnim ekstraktima i emulzijama ulje u vodenim biljnim ekstraktima s dodatkom komercijalnog proteina graška kao emulgatora

		RUŽMARIN	ORIGANO
UF	biljni ekstrakt	5,09 %	5,99 %
	emulgirani biljni ekstrakt	67,78 %	3,39 %
DPPH	biljni ekstrakt	42,11 %	17,07 %
	emulgirani biljni ekstrakt	69,23 %	76,47 %
FRAP	biljni ekstrakt	16,39 %	5,07 %
	emulgirani biljni ekstrakt	14,29 %	5,36 %

Biodostupnost UF najveća je za emulziju ulja u vodenom ekstraktu ružmarina (67,78 %) dok je najniža za emulziju ulja u vodenom ekstraktu origana (3,39 %) (tablica 7). Biodostupnost vodenih ekstrakata ružmarina i origana je slična te iznosi 5,09 % za ekstrakt ružmarina i 5,99 % za ekstrakt origana.

Gledajući rezultate antioksidacijske aktivnosti određivane DPPH metodom, vidljivo je kako su vrijednosti emulgiranih biljnih ekstrakata više u odnosu na biljne ekstrakte što znači da je emulgiranjem postignut željeni učinak očuvanja antioksidacijske aktivnosti. Najviše očuvanje DPPH vrijednosti pokazuje emulzija ulja u vodenom ekstraktu origana (76,47 %) dok najnižu pokazuje vodeni ekstrakt origana (17,07 %) (tablica 7).

Uspoređujući rezultate antioksidacijske aktivnosti određivane FRAP metodom, vidimo da su vrijednosti slične za biljne ekstrakte i emulgirane biljne ekstrakte. Najveći postotak biodostupnosti pokazuje vodeni ekstrakt ružmarina (16,39 %), dok najmanji pokazuje vodeni ekstrakt origana (5,07 %).

Rezultati u tablici 7 pokazuju kako je razlika biodostupnosti UF prije i nakon *in vitro* probave velika, ukazujući na nisku biodostupnost polifenolnih spojeva što se uvelike pripisuje promjenama pH vrijednosti tijekom procesa probave (Jurinjak Tušek i sur., 2020). Takvi rezultati u skladu su s istraživanjem kojeg su proveli Jurinjak Tušek i sur. (2020) gdje je dokazan pad vrijednosti UF nakon provedene *in vitro* simulacije probavnog sustava.

5. ZAKLJUČCI

1. Optimalni uvjeti za proces emulgiranja, dobiveni metodom odzivnih površina, iznose: koncentracija emulgatora: 0,52 %, koncentracija uljne faze: 16,17 %, brzina miješanja: 25000 rpm za ružmarin, odn. koncentracija emulgatora: 0,52 %, koncentracija uljne faze: 16,25 %, brzina miješanja 25000 rpm za origano.
2. Zeta potencijal svih pripremljenih emulzija manji je od -30 mV što pokazuje kako su sve pripremljene emulzije stabilne. Vrijednosti vodljivosti emulgiranih biljnih ekstrakata više su kod onih emulzija koje sadrže veći udio uljne faze.
3. Najvišu vrijednost UF ima emulgirani ekstrakt origana ($113,79 \pm 1,90 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) pripremljen pod uvjetima: koncentracija ulja: 10 %, koncentracija emulgatora: 1 %, brzina miješanja: 25000 rpm.
4. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodama za emulgirane biljne ekstrakte pokazuju kako najvišu antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom ima emulgirani ekstrakt origana ($0,83 \pm 0,06 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) pripremljen pri uvjetima: koncentracija ulja: 25 %, koncentracija proteina: 0,5 %, brzina miješanja: 35000 rpm dok najveću antioksidacijsku aktivnost izmjerenu FRAP metodom pokazuje emulgirani ekstrakt origana ($0,99 \pm 0,04 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) pripremljen pri uvjetima: koncentracija ulja: 15 %, koncentracija proteina: 1 %, brzina miješanja: 15000 rpm.
5. Početne vrijednosti UF te antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom više su kod biljnih ekstrakata u odnosu na emulgirane biljne ekstrakte.
6. Tijekom *in vitro* probave dolazi do značajnog smanjenja vrijednosti UF kao i antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH i FRAP metodama u biljnim ekstraktima i emulgiranim biljnim ekstraktima u odnosu na početne (nulte) vrijednosti.
7. Emulzije pripremljene pri optimalnim uvjetima imaju bolje očuvanje antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH metodom (76,47 % za emulgirani biljni ekstrakt origana) od vodenih ekstrakata origana i ružmarina (vodeni ekstrakt ružmarina 42,11 % odn. origana 17,07 %).
8. Emulgiranjem biljnih ekstrakata pod optimalnim uvjetima, samo je za emulgirani biljni ekstrakt ružmarina postignuto veće preživljavanje UF (67,78 %) u odnosu na vodene ekstrakte ružmarina i origana (5,09 % ružmarin, 5,99 % origano).

6. LITERATURA

Bhatt S, Tewari G, Pande C, Punetha D, Prakash O (2020) Antioxidative potential and compositional variation among *Origanum vulgare* L. collected from different districts of Kumaun Himalayas, Uttarakhand. *J essent oil res* **32**, 121-131. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1720834>

Brglez Mojer E, Knez Hrnčić M, Škerget M, Knez Ž, Bren U (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**, 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>

Berg JM, Tymoczko JL, Stryjer L (2013) Biokemija, 6. izd., (preveli Weygand Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb, str. 434.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Silveira Villar L, Escaleira LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>

Burger T, Zhang Y (2019) Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends Food Sci Technol* **86**, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.007>

Carrubba A, Abbate L, Sarno M, Sunseri F, Mauceri A, Lupini A i sur. (2019) Characterization of Sicilian rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) germplasm through a multidisciplinary approach. *Planta* **251**, 37. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03327-8>

Chakrabartty I, Mohanta YK, Nongbet A, Mohanta TK, Mahanta S, Das N, i sur. (2022) Exploration of Lamiaceae in Cardio Vascular Diseases and Functional Foods: Medicine as Food and Food as Medicine. *Front Pharmacol* **13**, 894814. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.894814>

Chemat F, Vian M, Cravotto G (2012) Green extraction of natural products: Concept and Principles. *Int J Mol Sci* **13**, 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>

Chen T, Liu Y, Zhu Q (2011) The conductivity Measurement of Polyethylene Glycol Dilaurate. *Open J Adv Mater Res* **317-319**, 718-722. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.317-319.718>

Chong WT, Tan CP, Cheah YK, Lajis AF, Habi Mat Dian NL, Kanagaratnam S i sur. (2018) Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween80-Span 80 using response surface methodology. *Plos one* **13**, 0202771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202771>

Collier CA, Mendiondol C, Raghavan S (2022) Tissue engineering of the gastrointestinal tract: the historic path to translation. *J Biol Eng* **16**, 9. <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00289-6>

Dalmoro A, Cascone S, Lamberti G, Barba A (2016) Encapsulation of Active Molecules in Microparticles Based on Natural Polysaccharides. *Nat Prod Commun* **12**, 863-866.

Dai J, Mumper RJ (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R (2010) Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int J Mol Sci* **11**, 1321-1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>

De Leon AC, Kidd MT, Corzo A (2010) Box-Behnken Design: alternative multivariate design in broiler nutrition research. *World's Poultry Sci J* **66**, 11820. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000668>

Diamant NE (1997) Neuromuscular Mechanisms of Primary Peristalsis. *Am J Med* **103**, 40-43. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)00320-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00320-3)

Dinnies Santos R, Shetty K, Lourenco Cecchini A, Da Silva Miglioranza LH (2012) Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina-ciencias agrarias* **33**, 655-666. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p655>

Dominguez-Avila J, Villa-Rodriguez JA, Montiel-Herrera M, Pacheco-Ordaz R, Roopchand DE, Venema K, i sur. (2021) Phenolic Compounds Promote Diversity of Gut Microbiota and Maintain Colonic Health. *Dig Dis Sci* **66**, 3270-3289. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06676-7>

Đurđević M (2020) Biodostupnost fenolnih spojeva iz emulzija ulje u vodenim ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae tijekom *in vitro* probave (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Fernandez-Ochoa A, Borrás-Linares I, Perez-Sanchez A, Barrajon-Catalan E, Gonzalez-Alvarez I, Arraez-Roman D, i sur. (2017) Phenolic compounds in rosemary as potential source of bioactive compounds against colorectal cancer: In situ absorption and metabolism study. *J Funct Food* **33**, 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.046>

Giacometti J, Brusač Kovačević D, Putnik P, Gabrić D, Bilušić T, Krešić G i sur. (2018) Extraction of bioactive compounds and essential oils from Mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res Int* **133**, 245-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>

Gird CE, Nencu I, Popescu ML, Costea T, Dutu LE, Balaci TD i sur. (2017) Chemical, antioxidant and toxicity evaluation of rosemary leaves and its dry extract. *Farmacia* **65**, 978-983.

Golubić P (2018) Visokonaponsko pražnjenje u ekstrakcijama bioaktivnih komponenata iz lista masline i ružmarina (završni rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Goodarzi F, Zendehboudi S (2019) A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical And Energy Industries. *Can J Chem Eng* **97**, 281-309. <https://doi.org/10.1002/cjce.23336>

Gonzalez Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Academia* **56**, 317-333.

Goncearuic M, Munetan MV, Butnara V, Duda MM, Benea, A., Jelezneac, T, i sur. (2021) Quality Variation of the Moldovan *Origanum vulgare* L. spp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* L. spp. *hirtum* (Link) Ietsw. Varieties in Drought Conditions. *Agriculture* **11**, 1211. <https://doi.org/10.3390/agriculture11121211>

Gordon MH (2012) Significance of Dietary Antioxidants for Health. *Int J Mol Sci* **13**, 173-179. <https://doi.org/10.3390/ijms13010173>

Gutriérrez-Grijalva EP, Picos-Salas MA, Leyva-López N, Criollo-Mendoza MS, Vazquez-Olivo G, Heredia B (2017) Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants* **7**, 2. <https://doi.org/10.3390/plants7010002>

Haensler J. (2016) Manufacture of Oil-in-Water Emulsion Adjuvants. U: Fox BD (ured.) Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols, Humana Press Inc, Totowa, str. 165-180.

Hinderink EBA, Münch K, Sagis L, Scroënb K, Berton-Carabin CC (2019) Synergistic stabilisation of emulsions by blends of dairy and soluble pea proteins: Contribution of the interfacial composition. *Food Hydrocolloids* **97**, 105206. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105206>

Hitl M, Kladar N, Gavarić N, Božin B (2021) Rosmarinic Acid – Human Pharmacokinetics and Health Benefits. *Planta Med* **87**, 273-282. <https://doi.org/10.1055/a-1301-8648>

Huizinga JD, Lammers JEP (2008) Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, 1-8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90380.2008>

Ibanez E, Kubaa Tovaa A, Senorans FJ, Cavero S, Reglero G, Hawthorne SB (2003) Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants. *J Agric Food Chem* **51**, 375-382. <https://doi.org/10.1021/jf025878j>

Ivanković M (2020) Optimiranje uvjeta emulgiranja biološki aktivnih spojeva iz biljnih

ekstrakata porijekom iz porodice Lamiaceae (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Jurinjak Tušek A, Marić L, Benković M, Valinger D, Jurina T, Gajdoš Kljusurić J (2020) *In vitro* digestion of the bioactives originating from the *Lamiacea* family herbal teas: A kinetic and PLS modeling study. *J Food Biochem* **44**, 13233. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13233>

Jurkin T, Gotic M (2013) Introduction to Microemulsions. *J Chemists Chem Eng* **32**, 389-399.

Katsouli M, Polychniatou V, Tzia C (2018) Optimization of water in olive oil nano-emulsions composition with bioactive compounds by response surface methodology. *LWT – Food Sci Technol* **89**, 740-748. <https://doi.org/10.1016/j.ltw.2017.11.046>

Kim S, Lee H, Kang SN (2012) Antioxidant Activities of Hot Water Extracts from Various Spices. *Int J Mol Sci* **12**, 4120-4131. <https://doi.org/10.3390/ijms12064120>

Kong F, Singh RP (2008) Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *J Food Sci* **73**, 67-80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>

Karadag A, Yang X, Ozcelik B, Huang Q (2013) Optimization of Preparation Conditions for Quercetion Nanoemulsions Using Response Surface Methodology. *J Agric Food Chem* **61**, 2130-2139. <https://doi.org/10.1021/jf3040463>

Kvaternik Š (2016) Koloidni sustavi i elektrokinetički (zeta) potencijal (završni rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Kutzli I, Griener D, Gibis M, Grossmann L, Baierb SK, Wiess J (2020) Improvement of emulsifying behavior of pea proteins as plant-based emulsifiers via Millard-induced glycation in electrospun pea protein-maltodextrin fibres. *Food Funct* **11**, 4049-4056. <https://doi.org/10.1039/d0fo00292e>

Larsson M, Hill A, Duffy J (2012) Suspension Stability; Why Particle Size, Zeta Potential and Rheology are Important. *Ann T Nord Rheol Soc* **20**, 1-35. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.003>

Lee SJ, Lee SY, Chung MS, Jin Hur S (2016) Development of novel in vitro human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. *J Funct Food* **22**, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.005>

Loper Francisco CR, Divino de Oliveira Junior F, Dutra Alving I, Dupas Hubinger M (2020) Plant proteins at low concentrations as natural emulsifiers for an effective orange essential oil microencapsulation by spray drying. *Colloids Surf A* **607**, 125470. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125470>

Lu W, Kelly AL, Miao S (2016) Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Sci Technol* **47**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.015>

Luxbacher T, Pušić T, Bukšek H, Petrinić I, Paar A. (2016) ZETA potencijal tekstilnih materijala: pregled. *Tekstil* **65**, 340-345.

McQuilken SA, (2021) The mouth, stomach and intestines. *Anaest inten care med* **22**, 330-335.

Mehmood T, Ahmad A, Ahmed A, Ahmed Z (2017) Optimization of olive oil based O/W nanoemulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach. *Food Chem* **229**, 790-793. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.0>

Munin A, Edwards-Lèvy F (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **3**, 793-829. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>

Niknam SM, Escudero I, Benito JM (2020) Formulation and Preparation of Water-In-Oil-In-Water Emulsions Loaded with a Phenolic-Rich Inner Aqueous Phase by Application of High Energy Emulsification Methods. *Foods* **9**, 1411. <https://doi.org/10.3390/foods9101411>

Oniga I, Pus C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah NK, Sevastre B, Marica R, i sur. (2018) *Origanum vulgare* spp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules* **23**, 2077. <https://doi.org/10.3390/molecules23082077>

Paff S, Slopek B (2004) Primjena planiranja eksperimenta u oplemenjivanju mineralnih sirovina. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik* **16**, 97-106.

Piementel-Moral S, Teixeira MC, Fernandes AR, Arrae-Roman D, Martinez-Ferez A, Sgura-Carretero A i sur. (2018) Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review. *Adv Colloid Interface Sci* **260**, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.08.007>

Rafael de Oliveira J, Camargo SEA, Dias de Oliveira L (2019) *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci* **26**, 5. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0499-8>

Radić A (2021) Emulzije u prehrani (završni rad) Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

Rattray RD, Van Wyk BE (2021) The Botanical, Chemical and Ethnobotanical Diversity of Southern African Lamiaceae. *Molecules* **26**, 3712. <https://doi.org/10.3390/molecules26123712>

Ravera F, Dziza K, Santini E, Cristofolini L, Liggieri L (2020) Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. *Adv Colloid Interface Sci* **288**, 102344. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102344>

Ren G, Sun Z, Wang Z, Zheng X, Xu Z, Sun D (2019) Nanoemulsion formation by the phase inversion temperature method using polyoxypropylene surfactants. *J Colloid Interface Sci* **540**, 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.01.018>

Ruskovska T, Maksimova V, Milenković D (2020) Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability – an overview and perspective. *Br J Nutr* **123**, 241-245. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002733>

Salopek B, Krasi D, Filipović S (1992) Measurement and application of zeta-potential. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik* **4**, 147-151.

Sensoy I (2021) A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro model. *Curr Res Food Sci* **4**, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>

Shahidi F, Zhong Y (2010) Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**, 930-940. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000044>

Singh H, Ye A, Horne D (2009) Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog Lipid Res* **48**, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.12.001>

Tarko T, Duda-Chodak A (2020) Influence of Food Matrix on the Bioaccessibility of Fruit Polyphenolic Compund. *J Agric Food Chem* **68**, 1315-1325. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07680>

Tavassoli SK, Mousavi SM, Emam-Djomeh Z, Razavi SH (2011) Chemical composition and evaluation of antimicrobial properties of Rosmarinus officinalis L. essential oil. *A J Biotech* **10**, 13895- 13899. <https://doi.org/10.5897/AJB11.788>

Tomac V (2021) Elektrokinetički potencijal (završni rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Ushikubo FY, Cuncha RL (2014) Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids* **34**, 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.016>.

Vallverdù-Queralt A, Regueiro J, Marínez-Huélamo M, Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela-Raventos RM (2014) A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem* **154**, 299-307. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.106>

Van de Linde S (2019) Single-molecule localization microscopy analysis with Image J. *J Phys D: Appl Phys* **52**, 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab092f>

Yang JX, Hong GB (2018) Optimized extraction for active compounds in *Glossogyne tenuifolia* using response surface methodology. *J Food Meas Charact* **13**, 663-676. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9979-x>

Yolmeh M, Mahdi Jafari S (2017) Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioprocess Techol.* **10**, 413-433. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2>

Yousif Mutalib L (2015) Comparison between conventional and modern methods for extraction of *Rosmarinus officinalis* L. leaves. *Zanco J Med Sci* **19**, 1029-1034. <https://dx.doi.org/10.15218/zjms.2015.0027>

Žanetić M, Škevin D, Vitanović E, Jukić Špika M, Perica S (2011) Ispitivanje fenolnih spojeva i senzorski profil dalmatinskih djevičanskih maslinovih ulja. *Pomolgia Croatica* **17**, 19-30.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja SARA SIROVEC izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis