

Optimiranje uvjeta emuliranja biološki aktivnih spojeva iz biljnih ekstrakata porijeklom iz porodice Lamiaceae

Ivanković, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:021428>

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 2020.

Monika Ivanković

1061/N

**OPTIMIRANJE UVJETA
EMULGIRANJA BIOLOŠKI
AKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNIH
EKSTRAKATA
PORIJEKLOM IZ PORODICE**

Lamiaceae

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

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Tamari Jurini na pristupačnosti, pomoći i svim savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem se i doc.dr.sc. Ani Jurinjak Tušek, doc.dr.sc. Maji Benković te doc.dr.sc. Davoru Valingeru na uloženom vremenu i pomoći tijekom izvedbe ovog rada. Također, zahvaljujem tvrtki Anton Paar Croatia d.o.o. na posudbi uređaja Litesizer bez kojeg provedba eksperimenata ne bi bila moguća.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i ostatku obitelji, zaručniku, prijateljima i kolegama na potpori i razumijevanju tijekom cijelog studiranja.

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

OPTIMIRANJE UVJETA EMULGIRANJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNIH EKSTRAKATA PORIJEKLOM IZ PORODICE *Lamiaceae*

Monika Ivanković, 1061/N

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj brzine miješanja, koncentracije emulgatora i udjela ulja na zeta potencijal emulzija ulja u vodenim ekstraktima mente s dodatkom tri emulgatora (PEG1500, PEG6000 i PEG20000). Optimiranje uvjeta emulgiranja provedeno je metodom odzivnih površina (eng. Response Surface Methodology, RSM). Određeni su optimalni uvjeti pripreme emulzija mente, koji su omogućili pripremu emulzija ulja u vodenim ekstraktima kadulje, lavande, majčine dušice, melise i mente s dodatkom PEG emulgatora. Emulzijama koje su pripremljene pri optimalnim uvjetima ispitivana su fizikalna (zeta potencijal, vodljivost, Feretov promjer) i kemijska (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost) svojstva. Dobiveni optimalni uvjeti procesa emulgiranja su: za PEG1500 koncentracija emulgatora 2,10 %, udio uljne faze u emulziji 34,99 %, brzina miješanja 15250 rpm; PEG6000 koncentracija emulgatora 3,52 %, udio uljne faze u emulziji 35 %, brzina miješanja 15000 rpm; PEG20000 koncentracija emulgatora 2,04 %, udio uljne faze u emulziji 25,98 %, brzina miješanja 15900 rpm.

Ključne riječi: *Lamiaceae*, emulzije ulje u vodenim ekstraktima biljaka, optimiranje, ekstrakcija, fenoli

Rad sadrži: 63 stranice, 23 slike, 7 tablica, 98 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: doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*, doc.dr.sc. *Maja Benković*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 30. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

OPTIMIZING THE CONDITIONS OF EMULSIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS ORIGINATING FROM THE *Lamiaceae* FAMILY

Monika Ivanković, 1061/N

Abstract: The aim of this study was to examine the influence of mixing rate, emulsifier concentration and oil content on zeta potential of oil emulsions prepared with aqueous mint extracts with the addition of three emulsifiers (PEG1500, PEG6000, PEG20000). The optimization of the conditions of the emulsification was performed by the response surface methodology (RSM). Optimal conditions for the preparation of mint emulsions were determined, which enabled the preparation of oil emulsions in aqueous extracts of sage, lavender, thyme, lemon balm and mint with the addition of PEG emulsifiers. The emulsions were tested for physical (zeta potential, conductivity, measurement of average Ferret diameter) and chemical (total polyphenolic content, antioxidant activity) properties. The obtained optimal conditions of the emulsification process are: For PEG1500 emulsifier concentration 2.10 %, oil phase content 34.99 %, mixing rate 15250 rpm; PEG6000 emulsifier concentration 3.52 %, oil phase content 35 %, mixing rate 15000 rpm; for PEG20000 emulsifier concentration 2.04 %, oil phase content 25.98 %, mixing rate 15900 rpm.

Keywords: *Lamiaceae*, emulsion plant extracts, optimization, extraction, phenols

Thesis contains: 63 pages, 23 figures, 7 tables, 98 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. *Tamara Jurina*, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor, PhD. *Maja Benković*, Assistant Professor

Reviewers:

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

Thesis defended: 30 September, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PORODICA BILJAKA USNAČA (<i>Lamiaceae</i>).....	2
2.1.1. Kadulja (<i>Salvia officinalis</i> L.)	2
2.1.2. Lavanda (<i>Lavandula angustifolila</i> Mill.).....	3
2.1.3. Majčina dušica (<i>Thymus serpyllum</i> L.).....	3
2.1.4. Melisa (<i>Melissa officinalis</i> L.).....	3
2.1.5. Menta (<i>Mentha piperita</i> L.).....	4
2.1.6. Taksonomija i morfologija	4
2.2. OKSIDATIVNI STRES, ANTIOKSIDANSI I NJIHOVA ULOGA	7
2.3. FENOLNI SPOJEVI.....	9
2.3.1. Fenolni spojevi biljaka iz porodice usnača.....	10
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA.....	11
2.4.1. Metode ekstrakcija	11
2.4.2. Ekstrakcija kruto-tekuće.....	12
2.5. EMULZIJE	12
2.5.1. Vrste emulzija.....	13
2.5.2. Mehanizam stvaranja emulzija	14
2.5.3. Stabilnost emulzija	14
2.5.4. Zeta potencijal	15
2.6. METODA ODZIVNIH POVRŠINA	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Uzorci	17
3.1.2. Aparatura i pribor	17
3.1.3. Kemikalije	18
3.2. METODE.....	19
3.2.1. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenata.....	19
3.2.2. Priprema emulzija ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora	19
3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja	20
3.2.4. Određivanje fizikalnih svojstava dobivenih emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljke	21
3.2.5. Određivanje kemijskih svojstava ekstrakata i emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljke.....	22
3.2.6. Metoda odzivnih površina (<i>Response surface methodology</i> ; RSM).....	26
3.2.7. Analiza varijance (ANOVA)	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENOM EKSTRAKTU MENTE S DODATKOM EMULGATORA	28

4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA EMULZIJA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU MENTE S DODATKOM EMULGATORA	30
4.3. REZULTATI OPTIMIRANJA UVJETA EMULGIRANJA S OBZIROM NA ZETA POTENCIJAL	32
4.4. FIZIKALNA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENIM EKSTRAKTIMA BILJAKA KADULJE, LAVANDE, MAJČINE DUŠICE, MELISE I MENTE	39
4.6. ODREĐIVANJE PROSJEČNOG FERETOVOG PROMJERA KAPLJICA U EMULZIJAMA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU BILJKE S DODATKOM EMULGATORA	43
5. ZAKLJUČCI	51
6. LITERATURA	53

1. UVOD

Biljna porodica usnača (*Lamiaceae*) jedna je od najvećih porodica među dvosupnicama. Sadrži više od 230 rodova, a mnoge biljne vrste iz ove porodice su veoma aromatične zahvaljujući vanjskim žlijezdama koje proizvode hlapljivo ulje (Sharafzadeh i Zare, 2011). Biljke ove porodice sadrže polifenole, biološki aktivne spojeve koji se koriste u prehrambenoj industriji, kozmetičkoj industriji te u proizvodnji pesticida (Trivellini i sur., 2016). Zahvaljujući fenolnim spojevima, odnosno flavonoidima, biljke ove porodice imaju značajnu antioksidacijsku aktivnost. Kako bi se mogli izolirati i identificirati fenolni spojevi u biljkama, potrebno je provesti ekstrakciju tih spojeva iz biljaka, a kako bi se dodatno zaštitila njihova funkcionalna svojstva tijekom prerade i probave, potrebno ih je stabilizirati na jedan od poznatih načina: mikroinkapsulacijom ili emulgiranjem.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj procesnih parametara kao što su brzina miješanja, koncentracija emulgatora i udio ulja u emulziji na stabilnost emulzije ulja u vodenom ekstraktu mente s dodatkom tri vrste emulgatora (PEG1500, PEG6000 i PEG20000). Određena su fizikalna (vodljivost i zeta potencijal) te kemijska (ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost) svojstva emulzije ulja u vodenom ekstraktu mente. Optimalni uvjeti za provedbu procesa emulgiranja su dobiveni primjenom metode odzivnih površina, s obzirom na izmjereni zeta potencijal pripremljenih emulzija. Nakon što su se odredili optimalni uvjeti za pripremu emulzije mente, slijedila je priprema emulzija ulja u vodenom ekstraktu pet biljaka iz porodice *Lamiaceae* (kadulja, lavanda, majčina dušica, melisa i menta). Pripremljenim emulzijama određivala su se fizikalna (zeta potencijal i vodljivost) te kemijska (ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost) svojstva. Također, odmah nakon završetka procesa emulgiranja pomoću mikroskopa je praćeno trenutno stanje kapljica emulzija ulja u vodenom ekstraktu biljaka uz dodatak emulgatora. Promjer kapljica emulzija izražen je pomoću Feretovog promjera.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PORODICA BILJAKA USNAČA (*Lamiaceae*)

Aromatične biljke iz porodice usnača (*Lamiaceae*) su poznate po visokom udjelu polifenola, povezanoj upotrebi u medicini te su cijenjene u proizvodnji esencijalnih ulja, farmaceutskih sastojaka i aroma (slika 1). Generalno, biljke iz porodice *Lamiaceae* su jednostavne za rast i razmnožavanje što je dovelo do uzgoja ovih biljaka diljem svijeta, osim u najhladnijim dijelovima Zemlje (Ahn i sur., 2020). Ova porodica sadrži 7136 vrsta u 236 rodova te je najveća porodica iz reda *Lamiales*. Neki rodovi iz ove porodice sadrže više od 250 vrsta, a to su *Salvia* (959), *Hyptis* (292), *Clonoredendrum* (327), *Thymus* (318), *Scutellaria* (461), *Plectratus* (406), *Stachys* (374) te *Nepeta* (252) (Trivellini i sur., 2016). Većina vrsta ove porodice su veoma aromatične zbog prisutnosti vanjskih žlijezda koje izlučuju hlapljivo ulje koje ima važnu ulogu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji te industriji proizvodnje pesticida (Sharafzadeh i Zare, 2011).



Slika 1. Izgled biljke iz porodice usnača (*Lamiaceae*) (Anonymous 1, 2017)

2.1.1. Kadulja (*Salvia officinalis* L.)

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) pripada rodu *Salvia*, jednom od najbrojnijih rodova porodice *Lamiaceae* koji sadrži 959 vrsta rasprostranjenih diljem svijeta (Nickavar i sur., 2008). Regije u kojima su pripadnice ove vrste rasprostranjene su Mediteransko područje, Južna Afrika, Srednja i Južna Amerika te jugoistočna Azija (Ajatollahi i sur., 2009). Kadulja je višegodišnja grmolika biljka karakteristična za regiju sjeverne obale Mediterana, ali je uzgajana i u mnogim drugim državama svijeta (Duletić-Laušević i sur., 2016). Njezini listovi ne koriste se samo za pripremu ekstrakata za terapiju kožnih bolesti, manjih rana, problema sa zubima, nego se koristi

i u liječenju gastrointestinalnih poremećaja u usitnjenom obliku ili kao vodeni ili vodeno – alkoholni ekstrakt za oralnu upotrebu (Mocan i sur., 2020). Nadalje, Hamidpour i suradnici (2014) navode kako se čaj od kadulje tradicionalno koristio za tretmane probavnih tegoba i problema s cirkulacijom, bronhitisa, kašlja, astme, depresije, kožnih problema te mnogih drugih bolesti i poremećaja.

2.1.2. Lavanda (*Lavandula angustifolila* Mill.)

Lavanda (*Lavandula angustifolila* Mill.) je biljka iz roda *Lavandula*, koja sadrži oko 30 vrsta, među kojima su najpoznatije lavanda (*L. angustifolila* Mill.), lavandin (*L. hybrida*) te šiljasta lavanda (*L. latifolia*) zbog široke upotrebe u proizvodnji eteričnih ulja (Boelens, 1995). Naziv “lavanda” dolazi od latinske riječi “lavare” što znači prati. U staroj Grčkoj, Perziji i Rimu lavanda se koristila kao miris u kupkama te kao antiseptik. U staroj Indiji i Tibetu smatrala se zacjeljujućim agensom, dok se u tibetanskoj medicini i dalje koristi za liječenje psihoza. Danas se u Europi i Americi lavanda često koristi kao antidepresiv te kao pomoć kod nesаницe (Basch i sur., 2004). Osim toga, koristi se u liječenju gastrointestinalnih, neuroloških i reumatskih poremećaja (Rabiei i sur., 2014).

2.1.3. Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.)

Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) je višegodišnja biljka iz roda *Thymus*, koji je karakterističan za zemlje koje se nalaze na zapadnom dijelu Mediteranskog područja (osobito na Iberskom poluotoku). Majčina dušica koristila se još u antička vremena zbog svojih svojstava i kemijskog sastava. Naziv joj dolazi od grčke riječi “thym”, što u prijevodu znači parfem, ukazujući na njezinu intenzivnu i ugodnu aromu (Nieto, 2020). Često se konzumira kao biljna infuzija, začin i aroma, dok se najviše uzgaja za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju (Taghouti i sur., 2020).

2.1.4. Melisa (*Melissa officinalis* L.)

Melisa (*Melissa officinalis* L.) je aromatična višegodišnja biljka iz porodice *Lamiaceae*, rasprostranje u Istočnoj Mediteranskoj regiji, Zapadnoj Aziji, jugoistočnom Sibiru i na sjeveru Afrike (Čanadanović-Brunet i sur., 2008). Latinski naziv “melisa” dolazi od grčke riječi “meliteia” (od meli, melitos), što znači med te označuje privlačnost biljaka pčelama (Stangler-Herodež i sur., 2003). Zahvaljujući sadržaju esencijalnih ulja i fenolnih kiselina, melisa ima

protuupalna, antibakterijska, antifungalna, antihistaminska i mnoga druga svojstva (Moradi i sur., 2016).

2.1.5. Menta (*Mentha piperita* L.)

Menta (*Mentha piperita* L.) je uzgajana višegodišnja biljka iz roda *Mentha*, koji uključuje 25 – 30 uzgajanih vrsta rasprostranjenih širom svijeta. *Mentha piperita* L. je najviše rasprostranjena na Mediteranskom području i u suptropskim regijama (Snoussi i sur., 2015). To je aromatična biljka koja se može koristiti svježa, osušena ili u obliku praha. Često se koristi u tradicionalnoj medicini kao pomoć kod gastrointestinalnih i respiratornih problema. Osim toga, eterično ulje mente ima važnu ulogu u proizvodnji parfema, kozmetike i farmaceutskih pripravaka (Cirlini i sur., 2016).

2.1.6. Taksonomija i morfologija

U tablici 1. nalazi se klasifikacija biljaka kadulje, lavande, majčine dušice, melise te mente. Vidljivo je kako svih pet biljaka pripada istoj porodici usnača (*Lamiaceae*), ali ne pripadaju istim vrstama.

Tablica 1. Klasifikacija biljaka prema integriranom taksonomskom informacijskom sustavu (ITIS, 2018)

	Kadulja	Lavanda	Majčina dušica	Melisa	Menta
Carstvo	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Odjeljak	<i>Tracheophyta</i>	<i>Tracheophyta</i>	<i>Tracheophyta</i>	<i>Tracheophyta</i>	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred	<i>Asteranae</i>	<i>Asteranae</i>	<i>Asteranae</i>	<i>Asteranae</i>	<i>Asteranae</i>
Red	<i>Lamiales</i>	<i>Lamiales</i>	<i>Lamiales</i>	<i>Lamiales</i>	<i>Lamiales</i>
Porodica	<i>Lamiaceae</i>	<i>Lamiaceae</i>	<i>Lamiaceae</i>	<i>Lamiaceae</i>	<i>Lamiaceae</i>
Rod	<i>Salvia</i> L.	<i>Lavandula</i> L.	<i>Thymus</i> L.	<i>Melissa</i> L.	<i>Mentha</i> L.
Vrsta	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lavandula angustifolila</i> Mill.	<i>Thymus serpyllum</i> L.	<i>Melissa officinalis</i> L.	<i>Mentha piperita</i> L.

Porodica usnača (*Lamiaceae*) obuhvaća zeljaste ili drvenaste biljke, četverostranih stabljika koje su vrlo često razvijene u obliku grmova. Listovi su većinom jednostavni, a smješteni su nasuprotno na stabljici. Cvjetovi su većinom dvospolni i jednosimetrični. Vjenčić je srastao u cijev koja se na vrhu proširuje i razdvaja u dvije različite usne. Gornja usna je vrlo kratka i ravna te sadrži dvije srasle latice, dok je donja usna puno dulja i sadrži tri srasle latice (Bačić i Sabo, 2007).

Kadulja je višegodišnja drvenasta biljka koja može narasti do 60 cm. Listovi su izduženi s bijelim dlačicama na donjoj površini lista te zeleni ili zeleno – sivi na gornjoj površini. Stabljika je uspravna ili okrenuta prema dolje s obilnim tamno zelenim grančicama. Cvjetovi su dugački od 2 do 4 mm te obično naraste od 5 do 10 ljubičasto – plavih cvjetova (slika 2). Cvjetaju od ožujka do srpnja, ovisno o okolišnim i klimatskim uvjetima (Jakovljević i sur., 2019).



Slika 2. Kadulja (*Salvia officinalis* L.) (Anonymous 2, 2017)

Lavanda je višegodišnja grmolika biljka koja može narasti do 1,5 m visine. Listovi su uski, rastu nasuprot jedan drugome te ostaju zimzeleni čak i u umjerenj klimi. Cvjetovi su nošeni na šiljku te posjeduju cimu s više cvjetova koji su općenito plave do ljubičaste boje (slika 3). Vrijeme cvjetanja je u kasno proljeće i rano ljeto, iako se može nastaviti i do kraja kolovoza. Iako listovi i cvjetovi proizvode eterično ulje, samo eterično ulje cvjetova ima komercijalnu vrijednost, budući da cvjetovi proizvode mnogo više eteričnog ulja nego listovi (Erland i Mahmoud, 2016).



Slika 3. Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) (Anonymous 3, 2014)

Majčina dušica je višegodišnja, aromatična i veoma polimorfna biljka koja može narasti od 10 do 40 cm u visinu. Sadrži mnogo grančica koje su drvenaste, uspravne i zbijene jedna uz drugu te su smečkaste ili baršunasto bijele boje (slika 4). Listovi su sitni i izduženi, a veličine su od 3 do 8 mm (Nieto, 2020). Cvjetovi su mali, plavo – ljubičaste boje te rastu u gustim skupinama, a vrijeme cvjetanja im je od svibnja do rujna (Asha i Lizzy, 2017).



Slika 4. Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) (Anonymous 4, 2007)

Melisa je višegodišnja grmolika biljka koja može narasti do 1 m u visinu. Listovi su ovalnog oblika te su veličine od 2 do 8 cm. Površina lista je gruba i žilasta, a prema rubovima nazubljena (Ardalani i sur., 2014). Korijen ove biljke je drvenast i cilindričnog oblika te sadrži velik broj bočnih korijena. Cvjetovi su dvospolni te rastu u žutoj, ljubičastoj ili bijeloj boji (slika 5). Glavni dijelovi biljke koji se koriste za izradu esencijalnih ulja su list i mladi izdanci (Talle i sur., 2012).



Slika 5. Melisa (*Melissa officinalis* L.) (Anonymous 5, 2013)

Menta je višegodišnja biljka karakterističnog i intenzivnog mirisa, koja raste od 10 do 120 cm u visinu (Khan Shinwari i sur., 2011). Listovi biljaka rastu na nasuprotnim dijelovima stabljike, koje su četverokutnog oblika (slika 6). Cvjetovi su svijetlo plave boje i nalaze se na rubovima grančica kao duguljasti i uski šiljci (Güney i sur., 2006).



Slika 6. Menta (*Mentha piperita* L.) (Anonymous 6, 2019)

2.2. OKSIDATIVNI STRES, ANTIOKSIDANSI I NJIHOVA ULOGA

Slobodni radikali su molekule koje su izgubile jedan elektron te su postale veoma nestabilne i jako reaktivne te posljedično mogu uzeti elektron od susjednih molekula. U tijelu čovjeka se ponašaju kao napadači tako što napadaju bitne proteine te DNA, što naposljetku može dovesti do disfunkcije, mutacije i karcinoma stanica. Slobodni radikali napadaju proteine i enzime te ih

inaktiviraju te tako prekidaju njihovu normalnu aktivnost. Također, napadaju i stanične membrane u stanicama koje se nalaze u krvnim žilama te otvrdnuvši i stanjujući arterije dovode do pojave srčanog udara i infarkta. Nadalje, napadajući kolagen uzrokuju njegovo umrežavanje što dovodi do ukočenosti zglobova. Konstantni napadaji od strane slobodnih radikala se povezuju s oksidativnim stresom (Hegde i sur., 2016).

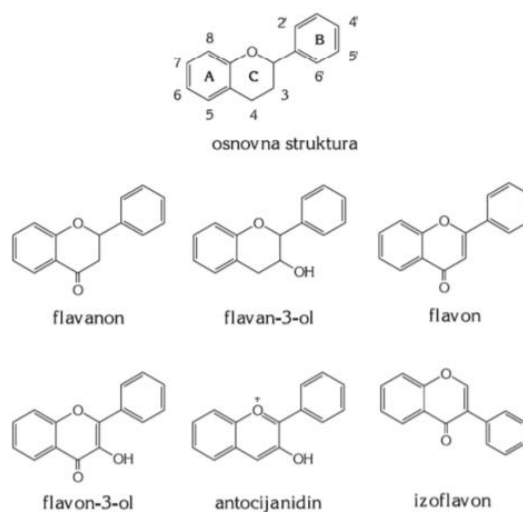
Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikali ($OH\cdot$) i singletni kisik (1O_2) pripadaju reaktivnim kisikovim radikalima (eng. „*reactive oxygen substances*“, ROS), a generiraju se kao metabolički nusprodukti bioloških sustava. Procesi kao što su proteinska fosforilacija, aktivacija nekih transkripcijskih faktora, apoptoza te diferencijacija ovise o odgovarajućem stvaranju i prisutnosti ROS-a u stanicama koje je potrebno zadržati na niskoj razini. Kada se stvaranje ROS-a poveća, oni počinju pokazivati štetne utjecaje na važne stanične strukture kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Mnoga istraživanja pokazuju kako je oksidativni stres uključen u nastanak i/ili progresiju raznih bolesti uključujući karcinom, dijabetes, metabolički poremećaji, ateroskleroza i kardiovaskularne bolesti (Pizzino i sur., 2017).

Antioksidansi su prirodni spojevi koji mogu spriječiti ili odgoditi neke vrste oštećenja stanica u tijelu. Postoji mnogo vrsta endogenih ili egzogenih molekula koje imaju ulogu u antioksidacijskoj obrani, a smatraju se biomarkerima oksidativnog stresa. U endogene antioksidanse spadaju enzimi (katalaza, glutation peroksidaza i superoksid dismutaza) te neenzimatski antioksidansi koji ulaze u interakciju s reaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima, a to su bilirubin, vitamin E i β -karoten prisutni u krvi. U egzogene antioksidanse spadaju vitamin C, vitamin E, lecitini, fenolni antioksidansi (resveratrol, fenolne kiseline, flavonoidi) i mnogi drugi (Liguori i sur., 2018). Najpoznatiji fenolni antioksidansi su fenolni spojevi a nalaze se u voću, povrću i raznim biljnim ekstraktima (Jebur i sur., 2016). Stoga se u zadnje vrijeme teži tome da se sintetski antioksidansi zamijene prirodnima, ponajviše zbog veće sigurnosti i prihvatljivosti od strane potrošača (Tzima i sur., 2018). Također, u novije vrijeme zbog pretjerane i neprikladne upotrebe antibiotika mnogi patogeni postaju otporni na lijekove te postaju prijetnja za ljudsko zdravlje. Stoga je nastao sve veći interes za pronalaskom novih spojeva s baktericidnim svojstvima, uključujući prirodne spojeve iz biljaka. Polifenolni ekstrakti pripremljeni od različitih medicinskih biljaka pokazuju antioksidacijska, antimikrobna, antiupalna te čak i antitumorska svojstva te su pokazala pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Brezoiu i sur., 2020).

2.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su spojevi koji sadrže jedan ili više aromatskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina te su najzastupljeniji sekundarni metaboliti kod biljaka. Njihova uloga uključuje obranu protiv ultraljubičastog zračenja i napada patogena, a osim toga zaslužni su za boju biljaka (pigmenti kao što su antocijani) te za organoleptička svojstva. Biljni fenoli uključuju fenolnu kiselinu, flavonoide, tanine, stilbene i lignane (Dai i Mumper, 2010).

Flavonoidi su fenoli koji su najzastupljeniji u ljudskoj prehrani, a njihova podjela je vidljiva na slici 7 (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).



Slika 7. Osnovna struktura i podjela flavonoida (Anonymous 7, 2014)

Osnovna struktura flavonoida sastoji se od jezgre flavana, koji se sastoji od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena (C6-C3-C6), označeni A, B i C (slika 7). Razni razredi flavonoida razlikuju se po razini oksidacije i zasićenja prstena C, dok se pojedini spojevi unutar razreda razlikuju po vrsti supstitucije prstena A i B. Razlika u strukturi i supstituciji će utjecati na stabilnost fenoksil radikala te samim time i na antioksidacijska svojstva flavonoida (Wojdyło i sur., 2007). Bitno je napomenuti kako je sastav komponenata biljaka također pod utjecajem klimatskih čimbenika, uvjeta rasta (vrsta tla, količina vode te temperatura), genetskog kemotipa i načina procesa ekstrakcije. Stoga, sastav fenolnih spojeva istih vrsta biljaka koje rastu u različitim regijama, može se značajno razlikovati (Shanida i sur., 2018). Antioksidacijski učinak fenolnih spojeva uglavnom je posljedica njihovih redukcijskih svojstava, a rezultat je nekoliko različitih mogućih mehanizama. Također imaju važnu ulogu u stabiliziranju lipidne peroksidacije i inhibiranju različitih vrsta oksidirajućih enzima. Ovi potencijalni mehanizmi antioksidacijskog učinka čine fenolne spojeve fitokemikalijama s pozitivnim utjecajem na

zdravlje čovjeka te se osim toga mogu koristiti u hrani kako bi se produžio rok trajanja (Shan i sur., 2005).

2.3.1. Fenolni spojevi biljaka iz porodice usnača

Biljke iz porodice usnača poznate su po mogućnosti proizvodnje visoke koncentracije fenolnih spojeva i ostalih antioksidanasa. Kako bi se točno odredili koji spojevi se nalaze u biljkama, koriste se razne metode, kao što su tekućinska kromatografija sa spektrofotometrijom i masena spektrometrija u kombinaciji s NMR spektroskopijom (Milevskaya i sur., 2017). Razredi fenolnih spojeva koji su najčešće najzastupljeniji u biljkama porodice usnača su hidroksicimetna kiselina i flavoni, najviše u obliku derivata kao što su esteri i glikozidi (Triantaphyllou i sur., 2001).

Kadulja sadrži fenolne spojeve s antioksidacijskom aktivnosti, kao što su flavonoidi, lignani i stilbeni te jednostavne fenolne kiseline. Od flavonoida i flavona ističu se apigenin i luteolin glikozidi, dok se od strane fenolnih kiselina ističu derivati kafeične kiseline i njihovi oligomeri, *p*-OH-benzoična, *p*-kumarinska, sirinđična i klorogenska kiselina. Glavni spojevi zaslužni za antioksidacijsku aktivnost su derivati kafeične kiseline i njihovi oligomeri, kao i ružmarinska kiselina te glikozidi apigenina i luteoilina (Dent i sur., 2017).

Lavanda prvenstveno sadrži klorogensku kiselinu, galnu kiselinu, umbeliferon, luteolin-7-O-glukozid i viteksin (Radulescu i sur., 2017). Osim toga, vrlo značajni fenolni spojevi koje sadrži lavanda su kafeična kiselina, apigenin, 7-metoksikumarin, 2-hidroksicimetna kiselina i mnogi drugi (Yadikar i sur., 2017).

Majčina dušica sadrži karakterističan fenolni spoj timol (2-izopropil-5-metil fenol), koji pokazuje značajnu antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost (Çakır i sur., 2020). Bitne sastavnice su također ružmarinska kiselina i njezini derivati, luteolin, apigenin te kafeična kiselina i njezini derivati (Taghouti i sur., 2020). Osim toga, sadrži flavonoide kao što su zeaksantin, pigenin, lutein te timonin (Dauqan i Abdullah, 2017).

Melisa sadrži flavonoide kao što su kvercitrin, ramnocitrin i luteolin, te fenolne kiseline kao što su ružmarinska, kafeična, protokatehnična kiselina te ekvivalentne galne kiseline (Miraj i sur., 2017). Posebnu antioksidacijsku aktivnost pokazuje ružmarinska kiselina, koja ima značajan terapijski učinak (Kamdem i sur., 2013).

Menta sadrži značajnu koncentraciju ružmarinske kiseline i njezinih derivata te salvianolne kiseline. Osim toga, sadrži hidroksibenzoičnu i hidroksicimetnu kiselinu. Od flavonoida sadrži luteolin i derivate apigenina (Cirlini i sur., 2016).

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala je prvi korak u iskorištavanju fitokemikalija u proizvodnji dodataka prehrani, sastojaka hrane, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Fenoli mogu biti ekstrahirani iz svježih, zamrznutih ili osušenih uzoraka biljaka, a prije same ekstrakcije uzorke je potrebno usitniti i homogenizirati (Dai i Mumper, 2010).

Nekoliko je stupnjeva ekstrakcije koji uključuju sljedeće procese: otapalo prolazi u krutu sredinu, otopljeni tvar otapa se u otapalu, otopljeni tvar difundira iz krute sredine te se naposljetku ta otopljeni tvar prikupi. Bilo koji čimbenik koji povećava raspršenost i topljivost može ubrzati i olakšati cijeli proces ekstrakcije. Čimbenici koji mogu utjecati na proces ekstrakcije su: temperatura, veličina čestica, svojstva otapala te vrijeme trajanja ekstrakcije. Prilikom odabira otapala izuzetno je bitno uzeti u obzir njegovu selektivnost, topljivost, cijenu te naravno i sigurnost. Budući da se treba voditi načelom “slično otapa slično”, ako se radi o polarnom otapalu, on će biti pogodan za uzorak koji je polaran. S druge strane, ako se radi o nepolarnom otapalu, on će biti pogodan za uzorak koji je nepolaran (Zhang i sur., 2018). Otapala mogu biti organske tekućine, superkritične tekućine ili tekućina koja može biti povezana s potpornim materijalom (ekstrakcija krute faze) (Smith, 2003). Za ekstrakciju fenola koriste se otapala kao što su metanol, etanol, propanol, aceton, etil acetat i njihova kombinacija, često s različitim udjelom vode. Osim odabira otapala, na dobivanje polifenola iz biljnih uzoraka također utječe i vrijeme ekstrakcije, čiji je raspon od 1 min pa sve do 24 h. Što je duže vrijeme ekstrakcije, to je veća vjerojatnost za oksidaciju fenola, osim ako se u otopinu ne doda reducens (Naczki i Shahidi, 2006).

2.4.1. Metode ekstrakcija

Metode ekstrakcije dijele se na konvencionalne i nekonvencionalne. Konvencionalne metode koje se koriste su: direktna destilacija, destilacija vodom i parom ili vodenom parom, Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija otapalima, maceracija te ekstrakcija uljima i hladno prešanje (Sparr Eskilsson i Bjorklund, 2000). Najveći nedostatak konvencionalnih metoda su dugo vrijeme postupka ekstrakcije i velik utrošak otapala (Mutalib, 2015). Budući da biljke sadrže malu količinu visokovrijednih bioaktivnih tvari koje opravdano zahtijevaju visoko učinkovite procese, potreba za učinkovitom ekstrakcijom bioaktivnih tvari iz biljaka bez gubitka aktivnosti i čistoće rezultirala je razvojem novih metoda ekstrakcije, tzv. nekonvencionalnih metoda (Vardanega i sur., 2014). Ove metode su učinkovitije u odnosu na konvencionalne metode,

potrebna je manja količina otapala te je prinos ekstrakcije veći. Još jedna prednost nekonvencionalnih metoda ekstrakcije je korištenje otapala koja nisu toliko štetna kao ona koja se koriste kod konvencionalnih metoda. Naime, pokazalo se da su jednostavni alkoholi (etanol i metanol) ili alkani (heptan i heksan) puno ekološki prihvatljiviji nego npr. dioksan, acetonitril, kiseline i tetrahidrofuran. Osim toga, uspoređujući mješavine otapala, mješavina metanola i vode ili etanola i vode pokazale su se prihvatljivijima od čistog alkohola ili mješavine propanola i vode (Mustafa i Turner, 2011). Neke od nekonvencionalnih metoda su ekstrakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem, ultrazvukom i visokonaponskim pražnjenjem (Mutalib, 2015). Osim ovim metoda, postoje i ekstrakcija superkritičnom tekućinom te ekstrakcija vrućom vodom (Smith, 2003).

2.4.2. Ekstrakcija kruto-tekuće

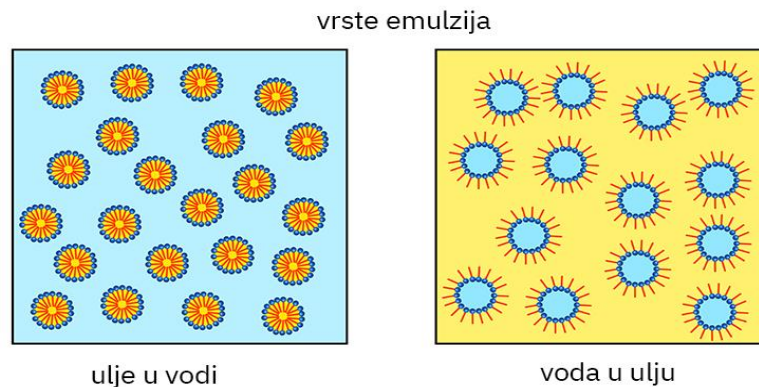
Jedna od metoda koja pripada konvencionalnim metodama je i ekstrakcija kruto-tekuće. Ova vrsta ekstrakcije koristi se u mnogim kemijskim, biokemijskim i farmaceutskim industrijama u svrhu dobivanja bioaktivnih tvari. Kvaliteta i uspješnost ekstrakcija kruto-tekuće većinom ovise o organskim otapalima koji imaju određene nedostatke kao što su toksični ostaci, kemijske promjene ekstrakata, štetan utjecaj na okoliš i čovjeka te dugotrajna izvedba. Stoga su se razvojem nekonvencionalnih metoda počela koristiti sigurnija i pogodnija otapala (Vardanega i sur., 2014).

2.5. EMULZIJE

Sustavi s barem dvije faze koje se ne mogu miješati zovu se disperzije. Disperzija je sustav koji se sastoji od disperzne faze u kontinuiranom protoku. Postoje tri glavne skupine disperzija, ovisno o svojstvima disperzne faze, a to su pjene (plin raspršen u tekućini), suspenzije (krutina u tekućini) te emulzije (tekućina u tekućem sustavu). Emulzije su heterogeni sustavi koji se sastoje od barem jedne tekućine koja se ne može miješati, a raspršena je u drugoj tekućini u obliku kapljica čiji je promjer veći od 0,1 mm. Takvi sustavi pokazuju malu stabilnost, ali dodatkom određenih spojeva (npr. površinski aktivnih agenasa) mogu postati stabilniji (Bendjaballah i sur., 2010).

2.5.1. Vrste emulzija

Emulzije su smjese dviju tekućina koje se međusobno ne mogu miješati. Tipovi emulzija koje postoje su emulzija voda u ulju (kapljice vode su disperzna faza, dok je ulje kontinuirana faza), ulje u vodi (kapljice ulja su disperzna faza, dok je voda kontinuirana faza), a postoje i složenije vrste emulzija kao što su vode-ulja-voda emulzije (tzv. višestruke emulzije) (Goodarzi i Zendehboudi, 2019). Na slici 8. mogu se vidjeti kako izgledaju dvije osnovne vrste emulzija.



Slika 8. Prikaz vrsta emulzija (Anonymous 8, 2020)

Emulzija voda u ulju (V/U) je vrsta emulzije u kojoj su kontinuirana faza većinom hidrofobni materijali kao što je ulje, dok je disperzna faza voda. One sadrže tri vrste tvari, a to su otapalo, emulgator i voda koji imaju važnu ulogu u stvaranju ovih emulzija. Ova vrsta emulzije više je zastupljena nego vrsta emulzije ulje u vodi (Akbari i Nour, 2018).

Emulzija ulje u vodi (U/V) je vrsta emulzije u kojoj ulje postoji kao disperzna faza, dok je voda kontinuirana faza ili disperzno sredstvo. Ova vrsta emulzija se često naziva „obrnutim“ emulzijama (Akbari i Nour, 2018).

Višestruke emulzije ((V/U)/V ili (U/V)/U) su složeni sustavi emulzija u kojima je disperzna faza sama po sebi emulzija prisutna u obliku kapljica. Prvenstveno se dijele na: ulje-voda-ulje emulzija te voda-ulje-voda emulzija. U emulziji ulje-voda-ulje, ulje se prvo dispergira u vodi te se zatim takva emulzija dispergira u drugoj uljnoj fazi. S druge strane, u slučaju emulzije voda-ulje-voda, voda se prvo dispergira u ulju te se zatim takva emulzija dispergira u drugoj vodenoj fazi (Lamba i sur., 2015).

2.5.2. Mehanizam stvaranja emulzija

Proces stvaranja emulzije naziva se emulgiranje. To je dinamičan proces koji nije spontan te je za stvaranje kapljica emulzija potrebna energija. Proces emulgiranja većinom zahtijeva određenu količinu mehaničke energije kako bi se dispergirala tekućina u obliku malih kapljica, u kontinuiranu (tekuću) fazu. Postoji nekoliko metoda emulgiranja, kao što su jednostavno miješanje, miješanje sa sustavom rotor – stator, injektiranje tekućina preko poroznih membrana te homogenizacija pod tlakom i ultrazvučna homogenizacija. Kako bi se veće kapljice mogle razbiti na kapljice manjih veličina mora se promijeniti oblik kapljice, a to se događa tijekom navedenih metoda emulgiranja (Akbari i Nour, 2018).

2.5.3. Stabilnost emulzija

Stabilnost emulzija odnosi se na mogućnost emulzije da se opire promjenama svojih svojstava kroz vrijeme; što je stabilnija emulzija, to će se svojstva sporije mijenjati. Glavni pokazatelj gubitka stabilnosti emulzije je povećanje promjera kapljica emulzije (Traynor i sur., 2013).

Stabilnost emulzija ovisi o raznim čimbenicima, kao što su temperatura, brzina miješanja, vrijeme i tlak. Kako bi se pripremila emulzija koja je stabilna, u sustav je potrebno dodati emulgator. Emulgatori su stabilizatori emulzija koji smanjuju površinsku napetost između dviju tekućina koje se ne mogu miješati te tako smanjuju odbojnu silu između tih dviju tekućina i smanjuju privlačenje između molekula iste tekućine (Kale i Deore, 2017). Budući da su emulgatori površinski aktivne molekule, adsorbiraju se na površini novonastalih kapljica tijekom homogenizacije tvoreći zaštitni sloj koji sprječava spajanje kapljica. Vrlo je važno izabrati prikladan emulgator kako bi emulzija bila što dulje stabilna (McClements i sur., 2007). Također, poznato je da polifenoli i drugi prirodni antioksidansi značajno povećavaju stabilnost jestivih ulja u emulziji jer imaju sposobnost donirati jedan vodikov atom slobodnom radikalu i smanjuju mogućnost nastanka lančanih reakcija radikala (Gallego i sur., 2013).

Emulgatori imaju dvojaku ulogu u stvaranju emulzija: olakšavaju stvaranje emulzije te poboljšavaju stabilnost emulzije. Emulgatori u svojoj molekularnoj strukturi imaju hidrofilni i lipofilni dio koji su koncentrirani na granici između ulja i vodene faze te posljedično smanjuju međufaznu napetost. Stoga, na taj način olakšavaju stvaranje emulzije tijekom homogenizacije (Guiotto i sur., 2015). Možemo ih podijeliti na sintetske i prirodne, a po sastavu mogu biti proteini, polisaharidi, fosfolipidi i surfaktanti. Budući da je u prehrambenoj industriji postalo sve bitnije da proizvodi imaju prirodne sastojke, sintetski emulgatori se sve više zamjenjuju prirodnim emulgatorima. Primjeri nekih prirodnih emulgatora su kazein i proteini sirutke

(proteini), pektin, guma arabika (polisaharidi) te lecitin (fosfolipidi) (Ozturk i McClemens, 2015).

Polietilen glikol (PEG) je polimer širokog raspona molekulskih masa, od 200 do desetak tisuća g mol^{-1} . Na sobnoj temperaturi polietilen glikoli molekulske mase <600 su bezbojne i viskozne tekućine, dok su oni s molekulskom masom >800 voštane i bijele krutine. Numerička oznaka kod imena (npr. PEG2000) označava njihovu molekulsku masu (Chen i sur., 2005). Ova vrsta emulgatora se sve više koristi zbog svojih dobrih svojstava te se svrstava u tzv. „zelena“ otapala. Svojstva koja ga odlikuju su biorazgradivost, netoksičnost, slaba zapaljivost, nehlapljivost te stabilnost pri visokim temperaturama, što ukazuje da nije štetan za okoliš. Također, prednost su mu i niska cijena te komercijalna dostupnost (Bulgariu i Bulgariu, 2008; Zhou i sur., 2014).

2.5.4. Zeta potencijal

Zeta potencijal (ζ) je električni potencijal na ravnini smicanja, koja je definirana kao udaljenost od površine kapljica ispod kojih protuioni ostaju snažno vezani za kapljicu kada se miču u električnom polju (McClements i sur., 2007). U slučaju kada sve kapljice emulzije imaju velik negativan ili pozitivan zeta potencijal, nastojat će se međusobno odbijati te više neće dolaziti do međusobnog spajanja kapljica. Međutim, ako čestice imaju male vrijednosti zeta potencijala, tada će doći do nedovoljnog odbijanja kako bi se spriječilo spajanje kapljica i flokulacija. Općenito, vrijednosti zeta potencijala koje pokazuju nestabilnost emulzija kreću se između $+30$ mV i -30 mV. Emulzije koje imaju vrijednosti zeta potencijala manje od -30 mV i veće od $+30$ mV smatraju se stabilnima (Larsson i sur., 2012).

2.6. METODA ODZIVNIH POVRŠINA

Kako bi se poboljšala izvedba i povećalo iskorištenje raznih procesa u sustavima bez povećanja troškova, primjenjuje se metoda optimiranja procesa (Baş i Boyaci, 2007). Tradicionalno se postupak optimiranja provodi praćenjem utjecaja jednog čimbenika u određenom vremenu na eksperimentalni odziv. U tom slučaju jedan faktor je podložan promjeni, dok drugi ostaje konstantan. Glavni nedostaci ovakvog načina optimiranja su isključivanje međusobnog djelovanja varijabli te povećanje broja eksperimenata potrebnih za postizanje optimalnih uvjeta, što znači i predugo trajanje provođenja eksperimenata (Bezerra i sur., 2008). Za razliku od tradicionalnog optimiranja, u novije vrijeme se koriste statističke metode koje ubrzavaju proces

optimiranja uzimajući u obzir i međudjelovanje varijabli. Jedna od tih metoda je metoda odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*, RSM).

Metoda odzivnih površina (RSM) je skup matematičkih i statističkih metoda koji omogućuje procjenu utjecaja nekoliko procesnih varijabli i njihovo međudjelovanje na varijablu odgovora. Ova metoda se koristi za razvoj i optimiranje raznih procesa, između ostalog i biokemijskih i biotehničkih procesa povezanih s prehrambenim sustavom, kao što su ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljaka (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005). Osim toga, ima važnu ulogu u dizajnu, razvoju i izradi novih proizvoda, a koristi se i za poboljšanje postojećih dizajna proizvoda (Baš i Boyaci, 2007). U prehrambenoj industriji, metoda odzivnih površina koristi se kod optimiranja raznih vrsta procesa ekstrakcije (maceracija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem, enzimska ekstrakcija), a neke od varijabli čiji se utjecaj prati su vrijeme, pH, koncentracija reagenasa te učinkovitost ekstrakcije. Uz to, primjenjuje se u optimiranju proizvodnje keksa, bezglutenskog kruha, hrane za dojenčad i mnogih drugih proizvoda. Također, pogodna je za optimiranje uvjeta sušenja (gubitak vode, tvrdoća, vlažnost i boja) te enzimske hidrolize (kod pilećeg mesa, sokova, kolača) (Yolmeh i Jafari, 2017). Stupnjevi uključeni u primjenu metode odzivnih površina su: (1) odabir nezavisnih varijabli koje su značajne za odabrani eksperiment, (2) odabir odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna i provođenje eksperimenata prema odabranoj eksperimentalnoj matrici, (3) matematičko-statistička obrada dobivenih eksperimentalnih podataka, (4) evaluacija prikladnosti modela, (5) provjera nužnosti i mogućnosti izvođenja pomaka u smjeru optimalne regije i (6) dobivanje optimalnih uvjeta za svaku varijablu (Bezerra i sur., 2008).

Prije primjene metode potrebno je odabrati eksperimentalni dizajn pomoću kojeg definiramo plan eksperimenta. Kako bi se aproksimirali eksperimentalni podaci koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom, koristi se eksperimentalni dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su: centralno-kompozitni plan pokusa, plošno centrirani kompozitni plan pokusa, faktorski plan pokusa na tri razine te Box-Behnken plan pokusa koji je korišten u ovom radu (Cajner, 2011). Box-Behnken plan pokusa predstavlja skupinu nezavisnih kvadratnih planova pokusa, a zahtjeva minimalno tri parametra za eksperimentalni dizajn. Prednost takvog plana pokusa je mogućnost ispitivanja većeg broja varijabli (3-10) te manjeg broja potrebnih eksperimenata, što štedi vrijeme i novac (Bezerra i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

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

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab, ST60T, Hrvatska)
- Vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Latvija)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S12, Engleska)
- Litesizer™ 500 (Anton Paar, Zagreb, Hrvatska)
- Mikroskop (BTC Tyle LCD – 35, Bresser, Njemačka)
- Uljna kupelj s integriranom miješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- OMNI TH220-PCRH homogenizator (Omni International, SAD)
- Magnetska miješalica (Heidolph Instruments, Njemačka)

Pribor:

- Staklene čaše (100, 200 i 500 mL)
- Stakleni štapić
- Kivete od kvarcnog stakla
- Omega kivete

- Staklene epruvete
- Eppendorf epruvete (2 mL)
- Menzure (100, 300 mL)
- Stakleni lijevak za filtraciju
- Celulozni filter papir, veličina pora 5-13 μm (LLG Labware Meckenheim, Njemačka)
- Automatske pipete (10-100 μL , 100-1000 μL , 1-10 mL)
- Odmjerna tikvica (250, 500 mL)
- Predmetno stakalce

3.1.3. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeća otapala i reagensi:

- Destilirana voda
- Suncokretovo ulje (Zvijezda, Zagreb, Hrvatska)
- 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
- PEG (polietilen glikol) 1500, Acros Organics, Njemačka
- PEG (polietilen glikol) 6000, Acros Organics, Belgija
- PEG (polietilen glikol) 20000, SigmaAldrich, 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 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$), 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

3.2. METODE

3.2.1. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenata

Eksperimenti ekstrakcije provedeni su tako da se u staklenu čašu volumena 200 mL odvaži 2 g usitnjenog osušenog bilja te se prelije sa 100 mL destilirane vode, prethodno zagrijane na unaprijed definiranu temperaturu (80 °C). Pripremljena smjesa se termostatira na definiranoj temperaturi u uljnoj kupelji s integriranom miješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka) pri brzini miješanja 250 rpm, tijekom 30 minuta. Nakon isteka vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira kroz celulozni filter papir (veličine pora 5-13 µm, 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.

3.2.2. Priprema emulzija ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora

Priprema emulzija ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora provedena je prema uvjetima definiranim Box-Behnken planom eksperimenta (tablica 2). U falcon epruvete volumena 15 mL otpipetira se odgovarajući volumen ekstrakta mente u kojem je prethodno otopljena odgovarajuća masa emulgatora polietilenglikola (PEG) te se otpipetira odgovarajući volumen suncokretovog ulja. Tako pripremljena smjesa se homogenizira pomoću homogenizatora (OMNI TH220-PCRH homogenizator, Omni International, SAD) tijekom 4 minute. Pripremljenim emulzijama mjeri se zeta potencijal i vodljivost pomoću instrumenta Litesizer 500.

Nakon što su određeni optimalni uvjeti za pripremu emulzije ulja u vodenom ekstraktu mente, isti optimalni uvjeti su se koristili u nastavku eksperimenta za pripremu emulzija ulja u vodenom ekstraktu kadulje, lavande, majčine dušice, melise i mente, s dodatkom tri emulgatora (PEG1500, PEG6000, PEG20000). Emulzije su se pripremale na prethodno opisani način.

Tablica 2. Plan eksperimenta za pripremu emulzija*

Broj pokusa	Koncentracija emulgatora [% w/w]	Koncentracija ulja u vodenom ekstraktu mente [% w/w]	Brzina miješanja [rpm]
1	2	30	15000
2	2	30	35000
3	6	30	15000
4	6	30	35000
5	4	25	15000
6	4	25	35000
7	4	35	15000
8	4	35	35000
9	2	25	25000
10	6	25	25000
11	2	35	25000
12	6	35	25000
13	4	30	25000
14	4	30	25000
15	4	30	25000
16	4	30	25000
17	4	30	25000

* Plan eksperimenta odnosi se na sva tri emulgatora (PEG1500, PEG6000 i PEG20000).

3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

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

Izračun i izražavanje rezultata:

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

$$\% \text{ vode} = (a - b) \cdot 100/m \quad [1]$$

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

gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g).

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

3.2.4. Određivanje fizikalnih svojstava dobivenih emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljke

3.2.4.1. *Određivanje zeta potencijala i vodljivosti*

Pripremljenim emulzijama određen je zeta potencijal te su im izmjerene vodljivosti. Odmah nakon završetka emulgiranja, 300 μL prethodno razrijeđenog uzorka emulzije (razrijeđene 5 puta) se prenese plastičnom špricom od 1 mL u omega kivetu. Zeta potencijal i vodljivost mjere se na uređaju Litesizer™ 500 (Anton Paar, Zagreb, Hrvatska). U programu Kaliopie prilikom mjerenja za svaki uzorak provode se 3 mjerenja, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

3.2.4.2. *Određivanje prosječnog Feretovog promjera kapljica u emulziji ulje u vodenom ekstraktu biljke*

Feretov promjer definira se kao okomita udaljenost između dvije tangente na suprotnim stranama čestice (Wang i Zheng, 2017). Prosječan Feretov promjer kapljica emulzija određen je računalnom obradom slike kapljice emulzije. Obrada slika radila se u probnoj verziji programa Image J (v 1.8.0. NIH, Maryland, SAD).

ImageJ jedan je od alata za analizu slika koji se koristi u različitim znanstvenim područjima. Program sadrži niz opcija za morfološku obradu slike i određivanje parametara objekata koji se analiziraju. Slike koje su se analizirale su slikane mikroskopom s fotoaparatom (BTC Tyle LCD – 35, Bresser, Njemačka), a predstavljaju netom pripremljene emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom tri PEG emulgatora. Nakon određivanja optimalnih uvjeta emulzija

mente, slikane su i pripremljene emulzije ulje u vodenom ekstraktu kadulje, lavande, majčine dušice, melise i mente s dodatkom tri PEG emulgatora. Na svakoj slici analizirano je 30 kapljica vizualno sličnih dimenzija, a uzimale su se u obzir samo cjelovite kapljice (one koje ulaze u granice slike). Feretov promjer određen je kao prosječna vrijednost 30 mjerenja Feretovih promjera kapljica emulzija.

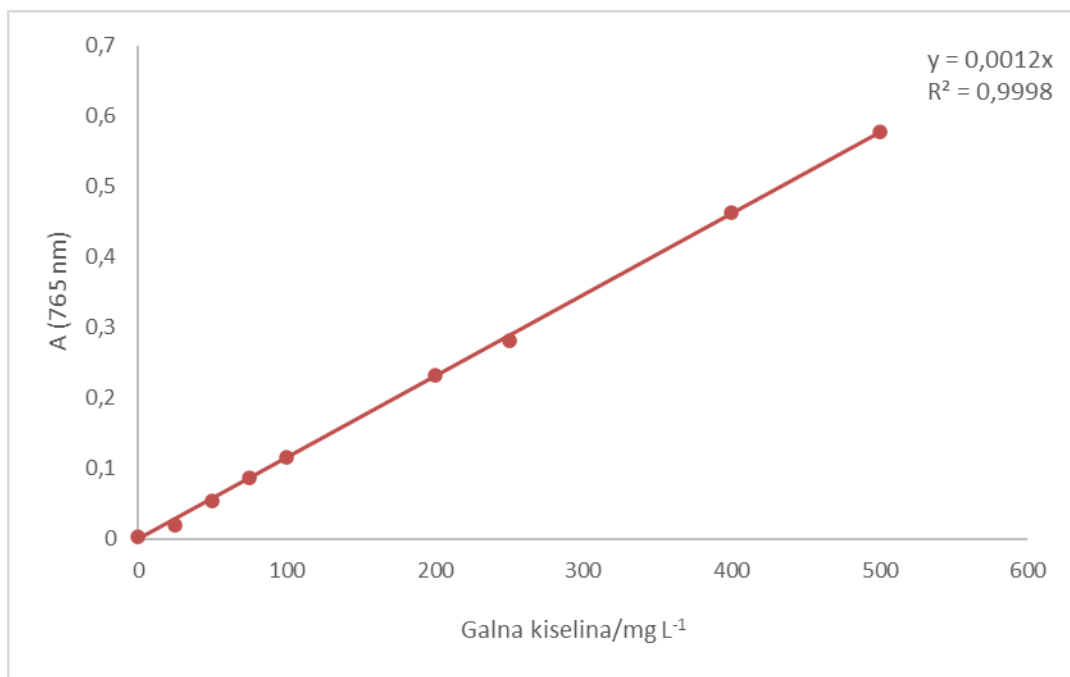
3.2.5. Određivanje kemijskih svojstava ekstrakata i emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljke

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

U staklenu epruvetu se otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa te 1,5 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3 započinje reakcija. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži 100 μL destilirane vode. Uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na valnoj duljini $\lambda = 765 \text{ nm}$. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ($\gamma_{\text{GAE}} = 0 - 500 \text{ mg L}^{-1}$) (slika 9). Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji polifenola potrebno je pripremiti otopinu galne kiseline koncentracije $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Odvaži se 0,005 g galne kiseline u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake. Iz te pripremljene otopine rade se razrjeđenja koja odgovaraju koncentracijama galne kiseline $0 - 400 \text{ mg L}^{-1}$. Umjesto uzorka, reakcijska smjesa sadrži 100 μL otopine galne kiseline poznatih koncentracija. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel. Na osi apscisa nanese su koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na osi ordinata izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 765 nm (slika 9). Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunava se koncentracija ukupnih polifenola.



Slika 9. Baždarni pravac za galnu kiselinu

pri čemu je:

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

y – apsorbancija (A) pri 765 nm

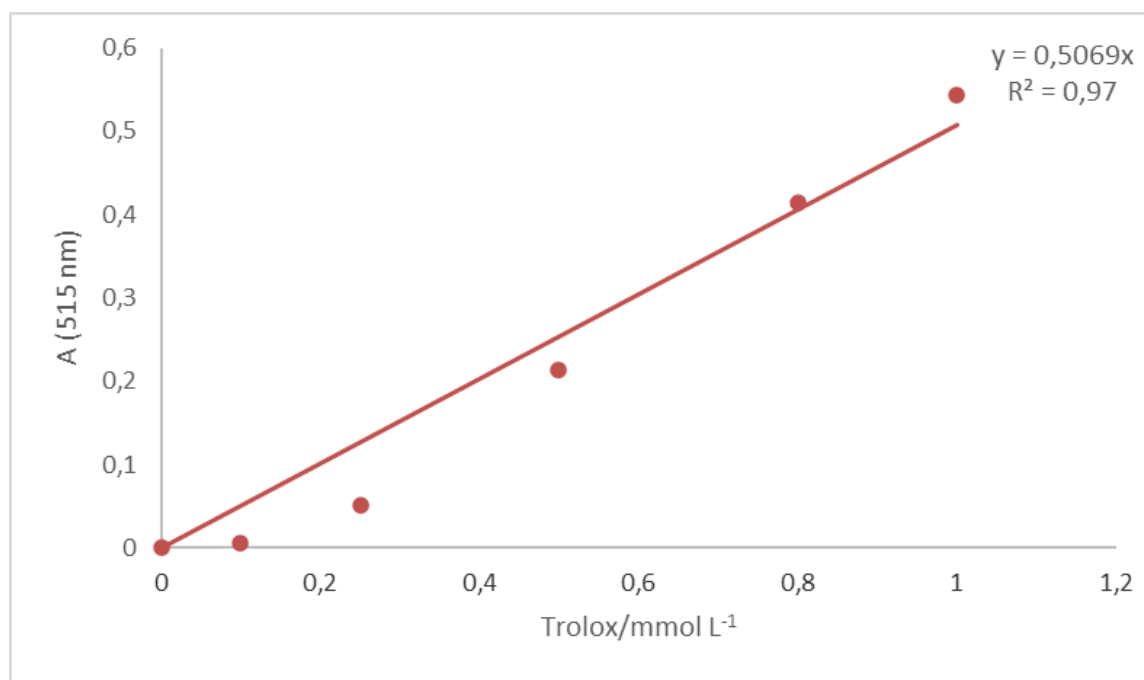
R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.5.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Pripremi se otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) koncentracije $0,094 \text{ mmol L}^{-1}$ u metanolu. Nakon toga u staklenu epruvetu se otpipetira $100 \mu\text{L}$ ispitivanog uzorka i doda $3,9 \text{ mL}$ prethodno pripremljene otopine DPPH. Uzorak se dobro homogenizira na vorteksu te se pokreće reakcija. Reakcija se odvija 30 minuta u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava $100 \mu\text{L}$ metanola. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Antioksidacijska aktivnost računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca Troloxa ($c_{\text{Trolox}} = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$), a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata Troloxa po gramu suhe tvari uzorka (slika 10).

Izrada baždarnog pravca:

Kod izrade baždarnog pravca postupak je jednak protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, ali umjesto 100 μL uzorka dodaje se 100 μL otopine Troloxa poznate koncentracije ($c = 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,8$ i 1 mmol L^{-1}). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Promjena apsorbancije (ΔA) računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka s Troloxom od apsorbancije slijepe probe. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac dobiven pomoću programa Microsoft Excel, pri čemu su na osi apscisa nanese koncentracije Troloxa (mmol L^{-1}), a na osi ordinata izračunate vrijednosti ΔA (slika 10).



Slika 10. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode

pri čemu je:

x –ekvivalent Troloxa (mmol L^{-1})

y –razlika slijepe probe i apsorbancije uzorka pri 515 nm

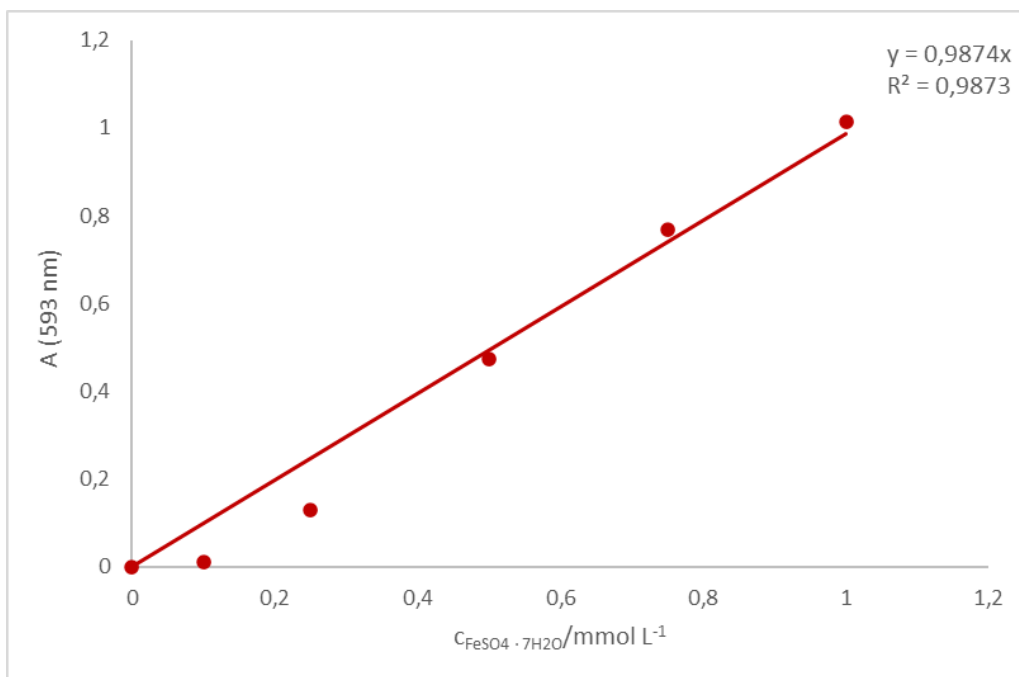
R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.5.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije 300 mmol L^{-1} , otopinu TPTZ-a koncentracije 10 mmol L^{-1} , vodenu otopinu željezov(III) klorid heksahidrata koncentracije 20 mmol L^{-1} . FRAP reagens priprema se tako da se dobro izmiješa 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a te 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, tako da omjer otopina bude 10 : 1 : 1. Za postupak mjerenja, u staklenoj epruveti se pomiješa 50 μL uzorka i 950 μL FRAP reagensa te se nakon 4 minute izmjeri apsorbancija na 593 nm. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka pomiješa 50 μL destilirane vode s 950 μL FRAP reagensa. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Antioksidacijska aktivnost računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($c_{\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}} = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$) (slika 11), a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ po gramu suhog uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Kod izrade baždarnog pravca postupak je jednak protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, ali umjesto 50 μL uzorka dodaje se 50 μL željezovog(II) sulfat heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) poznate koncentracije ($c = 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,75$ i 1 mmol L^{-1}). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Promjena apsorbancije (ΔA) računa se oduzimanjem apsorbancije slijepe probe od apsorbancije uzorka koje sadrži $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac dobiven pomoću programa Microsoft Excel, pri čemu su na osi apscisa nanese koncentracije $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (mmol L^{-1}), a na osi ordinata izračunate vrijednosti ΔA (slika 11).



Slika 11. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode pri čemu je:

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

y – razlika uzorka i apsorbancije slijepe probe pri 593 nm

R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.6. Metoda odzivnih površina (*Response surface methodology*; RSM)

U ovom istraživanju korištena je metoda odzivnih površina (RSM) primjenom programa Design-Expert 10.0 probna licenca (Stat-Ease, Minneapolis, SAD) za određivanje optimalnih uvjeta procesa emulgiranja koristeći Box-Behnken eksperimentalni dizajn, kako bi se ispitao utjecaj parametara kao što su koncentracija emulgatora (PEG), brzina miješanja te udio ulja u emulziji ulje u vodenom ekstraktu biljke na zeta potencijal pripremljenih emulzija. Svaki parametar (faktor) analiziran je na tri razine (koncentracija emulgatora = 2, 4, 6 %, udio ulja u emulziji = 25, 30, 35 %, i brzina miješanja = 15000, 25000, 35000 rpm).

3.2.7. Analiza varijance (ANOVA)

S ciljem ispitivanja učinka pojedinih procesnih parametara (koncentracija emulgatora, udio uljne faze u emulziji, brzina miješanja) na odziv (zeta potencijal pripremljenih emulzija), primijenjena je analiza varijance (ANOVA) s razinom značajnosti $p < 0,05$. ANOVA

predstavlja statističku metodu za testiranje međuovisnosti procesnih parametara, odnosno računa razlikuju li se dvije ili više grupa nezavisnih varijabli s obzirom na jednu (zavisnu) varijablu (Pfaff i Salopek, 2004).

Kako bi se opisali eksperimentalni podaci izmjerenih zeta potencijala za pripremljene emulzije ulja s vodenim ekstraktom mente, uz dodatak emulgatora PEG1500, PEG6000, PEG20000, upotrijebljen je kvadratni matematički model. Kao pokazatelj prilagodbe modela eksperimentalnim podacima, izračunat je koeficijent determinacije (R^2).

Statistička analiza je provedena korištenjem programa Design-Expert 10.0 probna licenca (Stat-Ease, Minneapolis, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proveden je postupak klasične ekstrakcije kruto-tekuće biološki aktivnih spojeva mente kako bi se dobili vodeni ekstrakti s kojima su se kasnije pripremale emulzije ulja u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora. U svrhu određivanja parametara koji bi omogućili optimalne vrijednosti zeta potencijala kao parametra praćenja stabilnosti pripremljenih emulzija ulja u vodenom ekstraktu mente, koristila se Box-Behnken metoda pomoću koje je definiran plan eksperimenta. Pri tome je analiziran utjecaj tri parametara procesa, a to su brzina miješanja, koncentracija emulgatora [%w/w] te udio uljne faze [%w/w] na tri razine (koncentracija emulgatora = 2, 4, 6 %, udio ulja u emulziji = 25, 30, 35 %, i brzina miješanja = 15000, 25000, 35000 rpm). Vrijeme trajanja procesa emulgiranja je 4 minute za sve eksperimente. Provedeno je 17 eksperimenata koji su prikazani u tablici 2. Dobivenim uzorcima su se nakon tog određivala fizikalna i kemijska svojstva.

Što se tiče fizikalnih svojstava, izmjereni su zeta potencijal i vodljivost emulzija ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom PEG emulgatora (PEG1500, PEG6000 i PEG20000) (tablica 3). Kemijska svojstva (UF) pripremljenih emulzija s biljnim ekstraktom mente su prikazana u tablici 4. Slaganje između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti zeta potencijala pripremljenih emulzija, uz dodatak sva tri emulgatora, prikazano je na slici 12, parametri modela su prikazani u tablici 5, dok su rezultati optimiranja uvjeta emulgiranja s obzirom na zeta potencijal prikazani na slici 13. Također je proveden proces emulgiranja pri optimalnim uvjetima, koji su dobiveni za mentu, i za kadulju, lavandu, majčinu dušicu, melisu i mentu. Rezultati mjerenja zeta potencijala i vodljivosti su prikazani u tablici 6, dok su rezultati mjerenja UF, DPPH i FRAP prikazani u tablici 7, za optimalne uvjete. Budući da je jedan od važnih parametara za određivanje stabilnosti veličina kapljica i njihova uniformnost, proučavana je veličina kapljica u emulziji, izražena kao prosječni Feretov promjer (slike od 14 do 23).

4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENOM EKSTRAKTU MENTE S DODATKOM EMULGATORA

Zeta potencijal opisuje se kao električni potencijal u koloidnim sustavima, a predstavlja razliku potencijala između čestica koje imaju površinski naboj. Pomoću zeta potencijala moguće je predvidjeti i kontrolirati stabilnost emulzija (Rios i sur., 2017). Budući da je stabilnost emulzije veća što je veći naboj između čestica, stabilnost emulzije proporcionalna je veličini zeta

potencijala (Lepur, 2017). Emulzije koje imaju vrijednosti zeta potencijala manje od -30 mV i veće od +30 mV smatraju se stabilnima. Vrijednosti zeta potencijala koje pokazuju nestabilnost emulzija kreću se između +30 mV i -30 mV (Larsson i sur., 2012).

U tablici 3. vidljivo je da je za emulgator PEG1500 uzorak broj 9 (broj okretaja 25000 rpm, koncentracija emulgatora 2 % te udio uljne faze 25 %) pokazao najmanju vrijednost zeta-potencijala (-32,128 mV), što ukazuje na najveću stabilnost pripremljene emulzije. S druge strane, uzorak broj 14 (broj okretaja 25000 rpm, koncentracija emulgatora 4 % te udio uljne faze 30 %) pokazao je najveću vrijednost zeta potencijala (-17,397 mV), što ukazuje na najmanju stabilnost emulzije. Što se tiče vodljivosti, ona se kreće u rasponu od 0,195 mS cm⁻¹ (uzorak 7) do 0,263 mS cm⁻¹ (uzorak 16). Kod emulgatora PEG6000 najstabilniji uzorak je pod brojem 7 (broj okretaja 15000 rpm, koncentracija emulgatora je 4 %, udio uljne faze 35 %), gdje zeta potencijal iznosi -31,862 mV. Najmanju stabilnost pokazao je uzorak broj 10 (broj okretaja 25000 rpm, koncentracija emulgatora 6 % te udio uljne faze 25 %) s izmjerenim zeta potencijalom u vrijednosti od -25,078 mV. Vrijednosti vodljivosti se kreću od 0,154 mS cm⁻¹ (uzorak 12) pa sve do 0,228 mS cm⁻¹ (uzorak 2). Kod emulgatora PEG20000 najstabilniji uzorak je pod brojem 1 (broj okretaja 15000 rpm, koncentracija emulgatora 2 %, udio uljne faze 30 %) s izmjerenim zeta potencijalom u vrijednosti od -23,401 mV, dok je najmanje stabilan uzorak broj 6 (broj okretaja 35000 rpm, koncentracija emulgatora 4 % te udio uljne faze 25 %) s izmjerenim zeta potencijalom u vrijednosti od -17,680 mV. Vrijednosti vodljivosti kreću se od 0,144 mS cm⁻¹ (uzorak 12) do 0,198 mS cm⁻¹ (uzorak 9). Uspoređujući vrijednosti izmjerenih zeta potencijala svih uzoraka sa sva tri emulgatora, vidi se kako se najstabilnijim pokazao uzorak broj 9 s dodatkom emulgatora PEG1500 (zeta potencijal iznosi -32,128 mV), dok se najmanje stabilnim pokazao uzorak broj 6 s dodatkom emulgatora PEG20000 (zeta potencijal iznosi -17,680 mV). Gledajući sve vrijednosti, može se vidjeti kako se dodatak emulgatora PEG1500 pokazao najboljom opcijom po pitanju stabilnosti emulzije. Što se tiče vodljivosti, najveću vrijednost pokazuju emulzije koje sadrže emulgator PEG1500, dok najmanje vrijednosti pokazuju one emulzije koje sadrže emulgator PEG20000, što je i prema očekivanom. Chen i suradnici (2011) proveli su mjerenje vodljivosti PEG dilaurat emulgatora različitih molekulskih masa (200, 400, 600) različitih stupnjeva polimerizacije te su dokazali da je vodljivost veća ako se poveća udio vodene faze te ako je molekulska masa emulgatora manja. Najveću vodljivost imala je emulzija s PEG emulgatorom najmanje molekulske mase (PEG200), dok je najveću vodljivost imala emulzija s emulgatorom najveće molekulske mase (PEG400).

Tablica 3. Fizikalna svojstva emulzija ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora

Uzorak	Zeta potencijal (mV)			Vodljivost (mS cm ⁻¹)		
	PEG1500	PEG6000	PEG20000	PEG1500	PEG6000	PEG20000
1	-28,075±0,990	-28,038±0,254	-23,401±0,118	0,221±0,007	0,199±0,002	0,165±0,003
2	-22,201±0,753	-30,135±0,866	-18,789±0,367	0,235±0,009	0,228±0,008	0,194±0,005
3	-29,783±0,927	-28,273±0,398	-18,119±0,447	0,203±0,005	0,168±0,005	0,159±0,005
4	-28,040±0,599	-25,115±0,402	-19,724±0,261	0,231±0,009	0,189±0,006	0,171±0,006
5	-27,852±0,388	-26,279±0,615	-21,208±0,574	0,221±0,004	0,185±0,004	0,190±0,008
6	-31,259±1,283	-25,317±0,826	-17,680±0,448	0,232±0,008	0,215±0,006	0,166±0,004
7	-30,898±1,420	-31,862±0,954	-23,164±0,862	0,195±0,006	0,180±0,006	0,163±0,006
8	-28,565±0,661	-28,194±0,889	-19,474±0,504	0,222±0,008	0,188±0,007	0,176±0,006
9	-32,128±1,562	-28,064±0,877	-21,905±0,706	0,236±0,009	0,214±0,007	0,198±0,008
10	-29,457±1,244	-25,078±0,723	-18,097±0,433	0,212±0,007	0,186±0,006	0,175±0,006
11	-29,076±0,754	-30,645±0,916	-22,913±0,750	0,237±0,008	0,188±0,006	0,169±0,007
12	-29,311±0,811	-27,245±1,063	-19,195±0,221	0,220±0,009	0,154±0,005	0,144±0,005
13	-27,439±0,494	-27,985±0,761	-19,969±0,647	0,213±0,005	0,182±0,005	0,168±0,006
14	-17,397±0,869	-28,144±0,727	-19,510±0,398	0,215±0,008	0,173±0,004	0,165±0,003
15	-26,885±0,559	-27,024±0,541	-17,707±0,767	0,225±0,008	0,178±0,005	0,175±0,006
16	-27,598±1,292	-31,470±1,234	-19,632±0,506	0,263±0,010	0,196±0,007	0,173±0,006
17	-25,832±1,875	-27,859±1,111	-23,063±0,537	0,215±0,007	0,184±0,007	0,173±0,007

4.2. KEMIJSKA SVOJSTVA EMULZIJA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU MENTE S DODATKOM EMULGATORA

Nakon određivanja fizikalnih svojstava, dalje su analizirana kemijska svojstva emulzija ulja u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora. Ukupni polifenoli (UF) u emulzijama su određivani Folin-Ciocalteu metodom. U tablici 4 prikazani su dobiveni rezultati. Iz tablice je vidljivo da je za emulgator PEG1500 najveći udio polifenola $UF = 58,398 \pm 1,619 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ sadržavao uzorak broj 13 (koncentracija emulgatora 4 %, udio uljne faze 30 %, brzina miješanja 25000 rpm), dok je najmanji udio polifenola $UF = 2,634 \pm 2,105 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ imao uzorak broj 9 (koncentracija emulgatora 2 %, udio uljne faze 25 %, brzina miješanja 25000 rpm). Kod emulgatora PEG6000 najveći udio polifenola $UF = 75,918 \pm 3,725 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$, ima uzorak broj 6 (koncentracija emulgatora 4 %, udio uljne faze 25 %, brzina miješanja 35000 rpm), dok najmanji udio polifenola ima uzorak broj 13 ($6,183 \pm 3,563 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). S druge strane, kod emulgatora PEG20000 najveći udio polifenola $UF = 72,368 \pm 4,534 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ sadržavao je uzorak broj 11 (koncentracija emulgatora 2 %, udio uljne faze 35 %, brzina miješanja 25000 rpm), a najmanji udio polifenola $UF = 0,916 \pm 1,295 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ uzorak broj 12 (koncentracija emulgatora 6 %, udio uljne faze 35 %, brzina miješanja 25000 rpm). Ukupno gledajući, najveći udio polifenola imao je uzorak broj 6, koji je sadržavao emulgator PEG6000 ($75,918 \pm 3,725 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Najmanji pak udio polifenola sadržavao je uzorak broj 12, koji je sadržavao emulgator PEG20000 ($0,916 \pm 1,295 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Može se primijetiti kako nema nekog pravilnog rasta/pada vrijednosti ukupnih polifenola promjenom PEG emulgatora. Također, prema rezultatima se ne može zaključiti kakav utjecaj koncentracija emulgatora, udio ulja u emulziji te brzina miješanja imaju na udio polifenola. Međutim, može se zaključiti da su u zadnja četiri uzorka, koji su pripremljeni s istim omjerima emulgatora i ulja te su imali istu brzinu miješanja, kod PEG1500 vrijednosti ukupnih fenola bile sličnih vrijednosti (u rasponu od $30,344 \pm 0,810 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $44,543 \pm 2,105 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Kod PEG6000 vrijednosti se kreću u rasponu od $7,901 \pm 11,174 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $47,406 \pm 0,648 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. S druge strane, kod PEG20000 su opet vidljive slične vrijednosti izmjerenih ukupnih polifenola, u rasponu od $1,260 \pm 1,781 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $3,206 \pm 4,534 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Naime, Folin-Ciocalteu reagens koji se koristi kod ove metode ne razlikuje fenolne strukture pa može reagirati i sa šećerima i peptidima, stoga postoji mogućnost da budu ubrojani pod polifenole kod mjerenja ovom metodom (ako su topivi u vodi) (Adom i sur., 2003).

Tablica 4. Kemijska svojstva emulzija ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora

Uzorak	PEG1500 UF/mg_{GAE} g_{s.t.}⁻¹	PEG6000 UF/mg_{GAE} g_{s.t.}⁻¹	PEG20000 UF/mg_{GAE} g_{s.t.}⁻¹
1	4,695±6,639	53,360±0,000	9,962±14,089
2	4,466±6,316	63,780±10,202	10,649±15,060
3	30,802±2,753	14,771±1,781	45,688±3,077
4	19,924±0,324	8,817±12,469	42,367±3,563
5	24,733±5,830	60,803±5,668	1,031±1,457
6	51,642±1,781	75,918±3,725	4,466±6,316
7	22,558±2,105	63,551±8,907	4,237±5,992
8	34,123±11,983	65,154±2,753	2,405±2,429
9	2,634±2,105	49,238±2,591	12,939±2,105
10	17,405±2,915	13,512±5,182	7,901±0,810
11	12,252±0,486	55,879±5,506	72,368±4,534
12	9,161±12,955	9,848±13,927	0,916±1,295
13	58,398±1,619	6,183±3,563	55,536±12,793
14	30,344±0,810	13,855±3,077	3,206±4,534
15	39,505±1,134	7,901±11,174	2,290±3,239
16	40,650±4,372	21,871±6,639	1,260±1,781
17	44,543±2,105	47,406±0,648	2,290±3,239

4.3. REZULTATI OPTIMIRANJA UVJETA EMULGIRANJA S OBZIROM NA ZETA POTENCIJAL

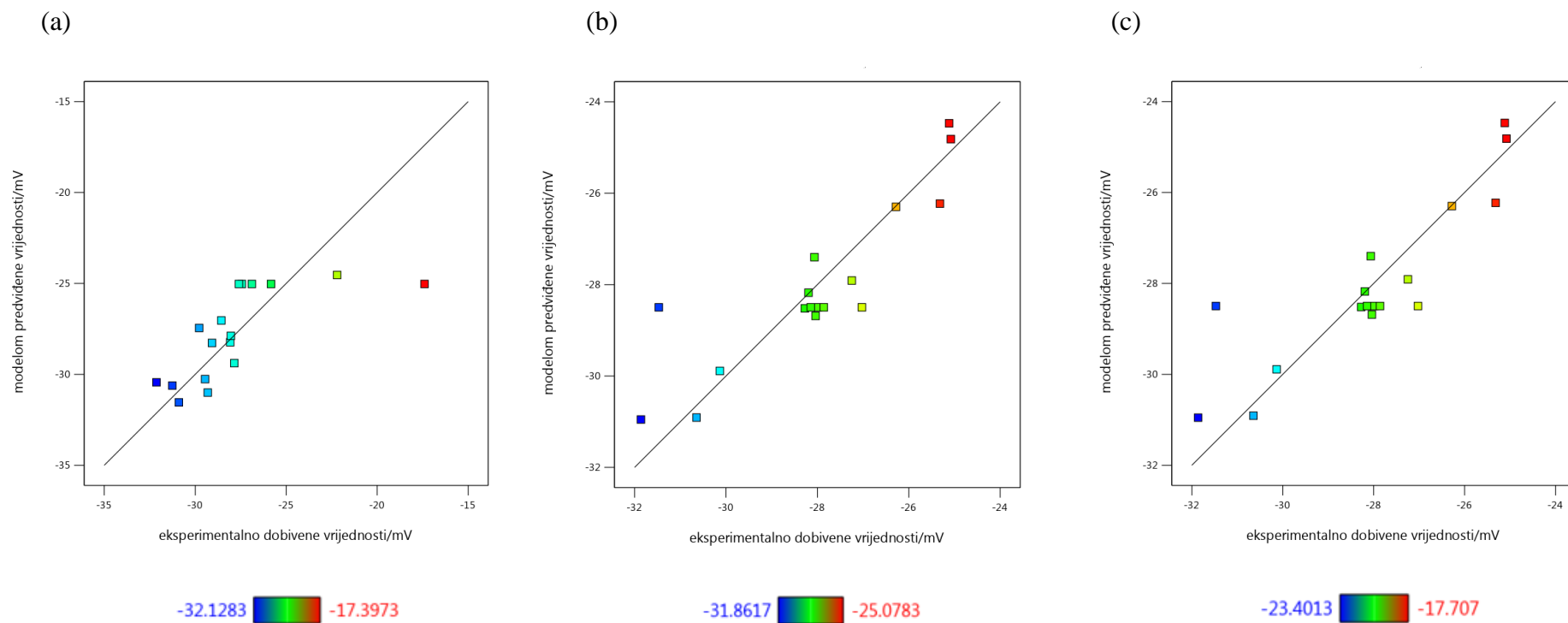
Cilj korištenja metode odzivnih površina bio je definirati optimalne uvjete za pripremu emulzija ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom PEG emulgatora. Analiziran je utjecaj tri varijable (koncentracija emulgatora, brzina miješanja te udio ulja u emulziji) na tri razine (koncentracija emulgatora = 2, 4, 6 %, udio ulja u emulziji = 25, 30, 35 %, i brzina miješanja = 15000, 25000, 35000 rpm) kako bi se ispitaio njihov utjecaj na zeta potencijal pripremljenih emulzija. Vrijeme trajanja procesa emulgiranja bilo je 4 minute.

Kako bi se opisali eksperimentalni podaci izmjerenih zeta potencijala za pripremljene emulzije ulja s vodenim ekstraktom mente, uz dodatak emulgatora PEG1500, PEG6000, PEG20000, upotrijebljen je kvadratni matematički model. Slaganje između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti zeta potencijala pripremljenih emulzija, uz dodatak sva tri emulgatora, prikazano je na slici 12. Za predloženi model dobiveno je slaganje između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti u iznosu od $R^2 = 0,4989$ (PEG1500), $R^2 = 0,7702$ (PEG6000) i $R^2 = 0,7081$ (PEG20000). Model se može smatrati primjenjivim ako koeficijent determinacije koji opisuje razliku između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti prelazi 0,75 (Matešić, 2019; Le Man i sur., 2010). Na temelju te pretpostavke može se zaključiti kako se upotrijebljeni model može primijeniti za opis eksperimentalnih vrijednosti zeta potencijala, izmjerenih u emulgiranim ekstraktima uz dodatak PEG6000 dok za preostala dva emulgatora model zahtijeva poboljšanje.

Tablica 5. Parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa emulgiranja s obzirom na zeta potencijal (A – brzina miješanja; B – koncentracija emulgatora, C – udio uljne faze)

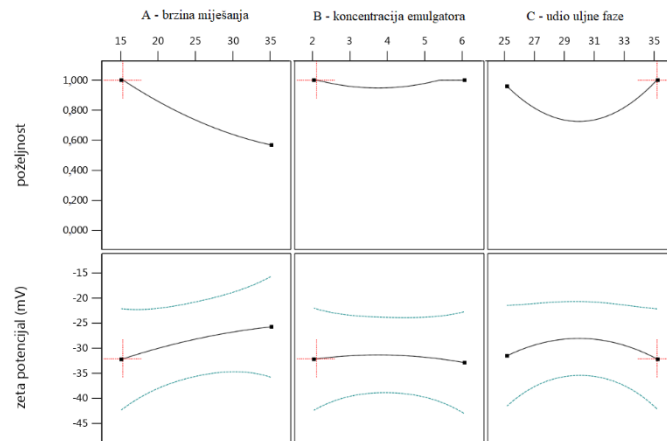
Parametri	Regresijski koeficijenti			Standardna pogreška			<i>p</i> vrijednost		
	PEG1500	PEG6000	PEG20000	PEG1500	PEG6000	PEG20000	PEG1500	PEG6000	PEG20000
Odsječak	-25,03	-28,4964	-19,98	1,6752	0,6640	0,7065			
A	0,8178	0,7114	1,1334	1,3243	0,5250	0,5585	0,5564	0,2175	0,0820
B	-0,6389	1,3961	1,4842	1,3243	0,5250	0,5585	0,6442	0,0325	0,0326
C	0,3559	-1,6509	-0,5872	1,3243	0,5250	0,5585	0,7959	0,0163	0,3281
AB	-1,033	1,3137	-1,55	1,8729	0,7424	0,7899	0,5985	0,1201	0,0898
AC	1,4351	0,6762	0,3303	1,8729	0,7424	0,7899	0,4686	0,3927	0,6884
BC	-0,7267	0,1034	-0,0226	1,8729	0,7424	0,7899	0,7096	0,8931	0,9780
A ²	-0,8225	0,2255	-0,0880	1,8255	0,7236	0,7699	0,6659	0,7644	0,9122
B ²	-1,1722	0,3805	0,0557	1,8255	0,7236	0,7699	0,5412	0,6152	0,9444
C ²	-3,7905	0,3578	-0,6072	1,8255	0,7236	0,7699	0,0765	0,6361	0,4561

Na temelju rezultata prikazanih u Tablici 5 vidljivo je da parametri modela odzivnih površina (linearni [A, B, C], kvadratni [A², B², C²] i interakcijski članovi [AB, AC, BC]) za optimiranje procesa emulgiranja s dodanim emulgatorom PEG1500 nemaju statistički značajan utjecaj na zeta potencijal ($p > 0,05$). Što se tiče optimiranja procesa emulgiranja s dodanim emulgatorom PEG6000, linearni članovi B i C pokazuju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na zeta potencijal. Povećanjem koncentracije emulgatora PEG6000 dolazi do porasta vrijednosti zeta potencijala, dok negativna vrijednost linearnog člana uz udio uljne faze znači da povećanjem udjela uljne faze dolazi do smanjenja vrijednosti zeta potencijala. Što se tiče optimiranja procesa emulgiranja s dodanim emulgatorom PEG20000, linearni član B pokazuje statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$) na vrijednosti zeta potencijala. Povećanjem koncentracije emulgatora PEG20000 dolazi do povećanja vrijednosti zeta potencijala.

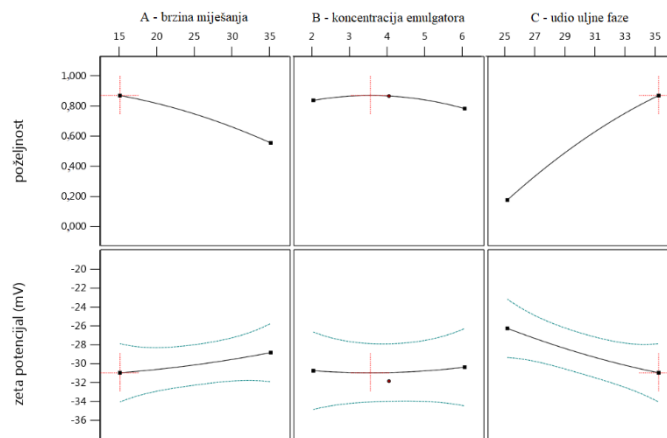


Slika 12. Usporedba eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti zeta potencijala izmjerenih u pripremljenim emulzijama ulje u vodenom ekstraktu mente uz dodatak emulgatora: a) PEG1500, b) PEG6000, c) PEG20000

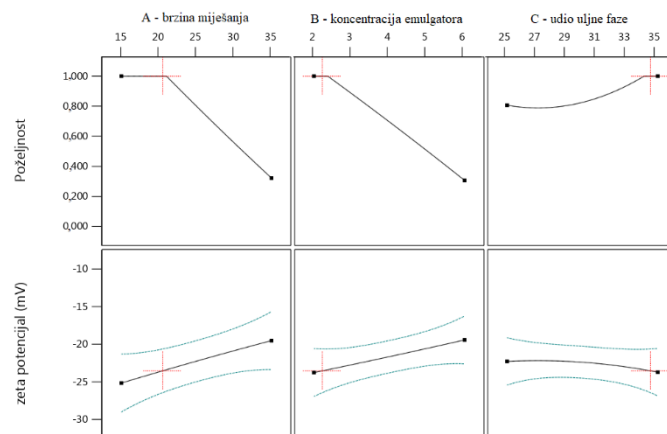
(a)



(b)



(c)



Slika 13. Rezultati optimiranja uvjeta emulgiranja s obzirom na zeta potencijal izmjeren u pripremljenim emulzijama ulje u vodenom ekstraktu mente uz dodatak emulgatora: a) PEG1500, b) PEG6000, c) PEG20000

Na temelju podataka dobivenih optimiranjem uvjeta emulgiranja s obzirom na zeta potencijal izmjeren u pripremljenim emulzijama ulje u vodenom ekstraktu mente uz dodatak PEG emulgatora vidljivo je da su optimalni uvjeti za pripremu emulzije s dodatkom PEG1500: koncentracija emulgatora 2,10 % w/w, udio uljne faze 34,99 % w/w te brzina miješanja 15250 rpm (slika 13a). Optimalna vrijednost zeta potencijala za emulzije s dodatkom PEG1500 iznosi -32,13 mV dok modelom predviđena vrijednost iznosi -32,15 mV. Na temelju grafičkog prikaza vidljivo je da povećanje brzine miješanja utječe na povećanje vrijednosti zeta potencijala, povećanje koncentracije emulgatora PEG1500 značajno ne utječe na vrijednosti zeta potencijala dok povećanje udjela uljne faze u emulziji dovodi do smanjenja vrijednosti zeta potencijala. Cilj je postići što nižu vrijednost zeta potencijala (zbog toga što su izmjerene vrijednosti negativne), odnosno postići vrijednost -32,15 mV.

Slika 13b prikazuje optimalne uvjete za pripremu emulzije s dodatkom PEG6000: koncentracija emulgatora 3,52 % w/w, udio uljne faze 35 % w/w te brzina miješanja 15000 rpm. Optimalna vrijednost zeta potencijala za emulzije s dodatkom PEG6000 iznosi -31,86 mV dok modelom predviđena vrijednost iznosi -30,97 mV. Na temelju grafičkog prikaza vidljivo je da povećanje brzine miješanja i koncentracije emulgatora PEG6000 značajno ne utječe na povećanje vrijednosti zeta potencijala dok povećanje udjela uljne faze u emulziji znatno doprinosi smanjenju vrijednosti zeta potencijala. Cilj je postići što nižu vrijednost zeta potencijala (zbog toga što su izmjerene vrijednosti negativne), odnosno postići vrijednost -30,97 mV.

Slika 13c prikazuje optimalne uvjete za pripremu emulzije s dodatkom PEG20000: koncentracija emulgatora 2,04 % w/w, udio uljne faze 25,98 % w/w te brzina miješanja 15 900 rpm. Optimalna vrijednost zeta potencijala za emulzije s dodatkom PEG20000 niža je u odnosu na emulzije s PEG1500 i PEG6000 te iznosi -23,40 mV dok modelom predviđena vrijednost iznosi -23,56 mV. Na temelju grafičkog prikaza vidljivo je da povećanje brzine miješanja i koncentracije emulgatora PEG20000 značajno utječe na povećanje vrijednosti zeta potencijala dok povećanje udjela uljne faze u emulziji znatno ne utječe na vrijednosti zeta potencijala. Cilj je postići što nižu vrijednost zeta potencijala (zbog toga što su izmjerene vrijednosti negativne), odnosno postići vrijednost -23,56 mV. Budući da se stabilnima smatraju emulzije koje imaju vrijednosti zeta potencijala niže od -30 mV ili više od +30 mV (Larsson i sur., 2012), može se zaključiti da u slučaju emulgatora PEG20000 nisu dobivene stabilne emulzije.

Kundu i suradnici (2015) provodili su eksperiment u kojem su koristili metodu odzivnih površina za optimiranje procesa emulgiranja petroleja (uljna faza) i vode s dodatkom natrij dodecil benzen sulfonata kao surfaktanta, pri čemu se ispitivao utjecaj četiri parametra (koncentracija ulja, koncentracija emulgatora, brzina miješanja te vrijeme trajanja miješanja). Svaki parametar analiziran je na tri razine, za što je algoritam predložio 29 eksperimenata. Modelom predviđeni optimalni uvjeti koji su time dobiveni su: 49,13 % (w/w) udio ulja u emulziji, 1,83 % koncentracija emulgatora, brzina miješanja 4962 rpm te brzina miješanja 7,10 minuta. Eksperimentalno dobivene vrijednosti iznosile su: 49 % (w/w) udio ulja u emulziji, 1,88 % koncentracija emulgatora, brzina miješanja 4950 rpm te brzina miješanja 7. minuta. Eksperimentom je potvrđena uspješnost optimiranja procesa emulgiranja metodom odzivnih površina. Nadalje, Raviadaran i suradnici (2018) u svojem su radu također koristili metodu odzivnih površina za proces određivanja optimalnih uvjeta izrade emulzija ulja u vodi te određivanja stabilnosti tih emulzija. Disperzna faza se sastojala od rafiniranog palminog ulja i kurkumina otopljenog u etanolu, dok je kontinuirana faza bila voda. Kako bi emulzija bila stabilna, dodao se emulgator Tween 80. Proces emulgiranja proveo se pomoću homogenizatora, brzina miješanja iznosila je 7000 rpm, dok je vrijeme trajanja procesa iznosilo 1 h. Metodom odzivnih površina ispitivao se utjecaj tri parametra (koncentracija emulgatora, tlak i broj krugova) na tri razine. Kako bi se odredila stabilnost emulzija, mjerio se zeta potencijal. Predviđeni optimalni uvjeti koji su dobiveni su tlak u iznosu od 377,59 bara, broj krugova 5,04 te koncentracija emulgatora Tween 80 0,98 %. Eksperimentom dobiveni podaci iznosili su: tlak 350 bar, broj krugova 5 te koncentracija emulgatora Tween 80 1 %, pri čemu je vrijednost zeta potencijala iznosila -32,8 mV. Takva stabilnost emulzije pripisuje se prisutnosti emulgatora Tween 80, pri čemu se kapljice emulzije stabiliziraju neionskim emulgatorom koji daje negativan naboj zbog prisutnosti slobodnih masnih kiselina.

Također, Salimi i suradnici (2014) su u svojem eksperimentu koristili metodu odzivnih površina za optimiranje uvjeta pripreme emulzije likopena. U sojino ulje dodan je likopen te je dodana mješavina koncentrata proteina sirutke (emulgator) i maltodekstrina koji također poboljšava stabilnost emulzije. Emulgiranje se vršilo na rotor-stator homogenizatoru, brzina miješanja je iznosila 10000 rpm, a vrijeme trajanja procesa bilo je 5 minuta. Ispitivao se utjecaj tri nezavisne varijable: koncentracija emulgatora (30-40 % w/w), koncentracija likopena (10, 15 i 20 % w/w) te brzina miješanja (14000, 16000 i 18000 rpm) na stabilnost emulzija. Stabilnost je mjerena praćenjem tri ovisne varijable: veličina kapljica, viskoznost i indeks stabilnosti emulzije. Metodom odzivnih površina dobiveni su optimalni uvjeti pripreme emulzije: koncentracija

emulgatora 37,16 %, koncentracija likopena 18,85 % te brzina miješanja 18000 rpm. Za predloženi model dobiveno je slaganje između modelom predviđenih vrijednosti i eksperimentalnih vrijednosti u iznosu od $R^2 = 0,9731$ i $R^2 = 0,9957$ te je zaključeno da se model može smatrati primjenjivim.

4.4. FIZIKALNA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENIM EKSTRAKTIMA BILJAKA KADULJE, LAVANDE, MAJČINE DUŠICE, MELISE I MENTE

Nakon pronalaska optimalnih uvjeta za pripremu emulzija mente, slijedila je priprema emulzija (sa sva tri emulgatora) ulja u vodenom ekstraktu pet biljaka – kadulja, lavanda, majčina dušica, melisa te menta po prethodno određenim optimalnim uvjetima. Pripremljenim emulzijama određivala su se fizikalna (zeta potencijal i vodljivost) te kemijska svojstva (udio ukupnih polifenola, DPPH, FRAP).

U tablici 6 mogu se vidjeti dobivene vrijednosti izmjerenih zeta potencijala i vodljivosti. Za sva tri emulgatora emulzija majčine dušice pokazala je najmanju vrijednost izmjerenog zeta potencijala, a samim time i najveću stabilnost. Kod emulgatora PEG1500 ta vrijednost je iznosila -51,654 mV, kod emulgatora PEG6000 -41,823 mV, dok je kod emulgatora PEG20000 ona iznosila -35,686 mV. S druge strane, najveće izmjerene vrijednosti zeta potencijala, a samim time i najmanju stabilnost pokazala je emulzija mente. Vrijednosti izmjerenih zeta potencijala za emulgator PEG1500 iznosi -28,873 mV, za emulgator PEG6000 iznosi -27,561 mV, dok za emulgator PEG20000 ona iznosi -19,066 mV. Iz tablice je također vidljivo kako se porastom molekulske mase emulgatora povećava vrijednost zeta potencijala, tj. smanjuje se stabilnost svih emulzija. Dakle, najveću stabilnost pokazuju emulzije s dodatkom emulgatora PEG1500, a najmanju stabilnost one emulzije s dodatkom emulgatora PEG20000. Gledajući vodljivost može se primijetiti kako se njezine vrijednosti kreću od najmanjih $0,063 \text{ mS cm}^{-1}$ (PEG6000, majčina dušica) do najvećih vrijednosti $0,186 \text{ mS cm}^{-1}$ (PEG6000, melisa). U ovom slučaju kod izmjerenih vrijednosti vodljivosti nije prisutan trend pada vrijednosti povećanjem molekulske mase PEG emulgatora, kao što je bio slučaj kod vrijednosti izmjerene vodljivosti pri određivanju optimalnih uvjeta za pripremu emulzija ulja u vodenom ekstraktu mente.

Tablica 6. Rezultati procesa pripreme emulzija ulje u vodenom ekstraktu kadulje, lavande, majčine dušice, melise i mente uz dodatak emulgatora, s obzirom na fizikalna svojstva (emulzije su pripravane pri optimalnim uvjetima koji se odnose na proces emulgiranja za vodeni ekstrakt mente)

Uzorak	Zeta potencijal (mV)			Vodljivost (mS cm ⁻¹)		
	PEG1500	PEG6000	PEG20000	PEG1500	PEG6000	PEG20000
Kadulja	-40,035±1,396	-35,003±1,241	-26,847±0,821	0,147±0,006	0,113±0,005	0,117±0,005
Lavanda	-50,389±1,336	-36,827±1,274	-30,399±1,221	0,079±0,053	0,099±0,004	0,114±0,005
Majčina dušica	-51,654±1,688	-41,823±1,320	-35,686±1,373	0,074±0,003	0,063±0,002	0,071±0,003
Melisa	-46,066±1,188	-31,779±1,225	-25,293±0,551	0,184±0,006	0,186±0,007	0,163±0,005
Menta	-28,873±1,263	-27,561±0,511	-19,066±0,362	0,145±0,005	0,176±0,005	0,134±0,006

4.5. KEMIJSKA SVOJSTVA EMULZIJA ULJA U VODENIM EKSTRAKTIMA BILJAKA KADULJE, LAVANDE, MAJČINE DUŠICE, MELISE I MENTE

Analiza kemijskih svojstva pokazala je raznolike rezultate, međutim iz tablice 7 je vidljivo kako isti uzorci pokazuju slične rezultate. Naime, u slučaju pripreme emulzija s PEG1500 emulgatorom, emulzija ulja u vodenom ekstraktu melise pokazala je najveće vrijednosti ukupnih fenola ($80,685 \pm 7,375 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$), DPPH ($0,371 \pm 0,007 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$) i FRAP ($0,836 \pm 0,158 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). S druge strane, lavanda je pokazala najmanje vrijednosti ($52,598 \pm 0,675 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$, $0,104 \pm 0,068 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$, $0,463 \pm 0,019 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Takav trend vidi se i kod ostalih PEG6000 emulgatora. Ukupno gledajući, najveće vrijednosti ukupnih fenola, DPPH i FRAP ima emulzija melise, dok najmanje vrijednosti ima emulzija lavande. Budući da procesi mljevenja i miješanja dovode do oslobađanja topline zbog velikih sila potrebnih da se materijal usitni i promiješa (Barbosa-Canovas i sur., 2005), moguće je da biljke sadrže bioaktivne spojeve koji su veoma osjetljivi na porast temperature. Također, moguće je da je tijekom procesa mljevenja uzorka i miješanja emulzije došlo do velikog oštećenja stanične strukture, što je moglo dovesti do pada antioksidacijskog kapaciteta. Još jedan razlog može biti odabir otapala kod procesa ekstrakcije. Rababah i suradnici (2010) u svom su radu dokazali da su između metanola, etanola i destilirane vode najbolje rezultate ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti pokazali metanol i etanol, kao bolji izbor otapala od vode. Nadalje, budući da nemaju svi dijelovi biljaka istu količinu ukupnih polifenola niti istu antioksidacijsku aktivnost, moguće da je i to utjecalo na izmjerene vrijednosti. Gallego i suradnici (2013) u svom radu su ispitivali ukupni sadržaj polifenola Folin-Ciocalteu metodom i antioksidacijsku aktivnost DPPH i FRAP metodama u biljnim ekstraktima različitih dijelova biljaka lavande, majčine dušice i ružmarina (list, cvijet i stabljika) pri čemu se kao otapalo koristila 50 %-tna otopina etanola. Osim ekstrakata, ispitivala se i učinkovitost emulzija ulja u etanolnom ekstraktu lavande, majčine dušice i ružmarina protiv oksidacije. U pripremi emulzija koristilo se suncokretovo ulje te je kao emulgator dodan Tween 20. Rezultati su pokazali da su najveći sadržaj ukupnih polifenola, kao i najveću antioksidacijsku aktivnost imali ekstrakti lista i cvijeta majčine dušice te lista lavande. S druge strane, najmanje vrijednosti sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti pokazali su ekstrakti cvijeta lavande i stabljika majčine dušice. Što se tiče emulzija, najbolje su se pokazale emulzije koje su sadržavale ekstrakte lista i cvijeta majčine dušice, kao i lista i stabljike ružmarina. Najmanje učinkovitima su se pokazale emulzije koje su sadržavale ekstrakte cvijeta majčine dušice i lista lavande. Uspoređujući rezultate ovog rada s navedenim istraživanjem, i u ovom radu cvijet lavande pokazuje najmanje

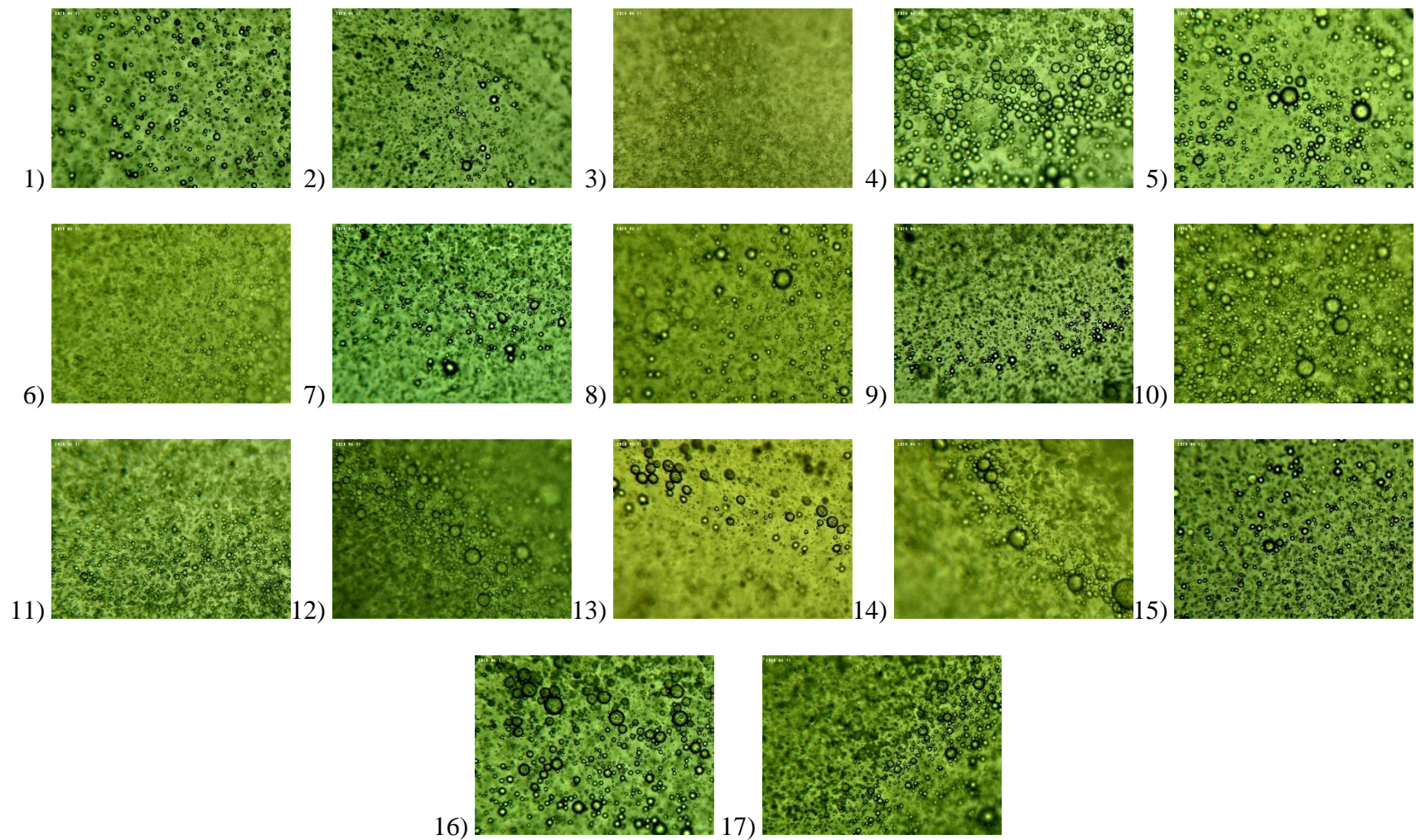
Tablica 7. Rezultati procesa pripreme emulzija ulje u vodenom ekstraktu kadulje, lavande, majčine dušice, melise i mente uz dodatak emulgatora, s obzirom na kemijska svojstva (emulzije su pripravane pri optimalnim uvjetima koji se odnose na proces emulgiranja za vodeni ekstrakt mente)

Uzorak	UF/ mg _{GAE} g _{s.t.} ⁻¹			DPPH/ mmol _{Trolox} g _{s.t.} ⁻¹			FRAP/ mmol _{FeSO4·7H2O} g _{s.t.} ⁻¹		
	PEG1500	PEG6000	PEG20000	PEG1500	PEG6000	PEG20000	PEG1500	PEG6000	PEG20000
Kadulja	59,256±0,135	89,603±12,184	107,695±7,446	0,250±0,106	0,197±0,004	0,192±0,074	0,678±0,017	0,785±0,083	0,757±0,061
Lavanda	52,598±0,675	42,574±4,050	42,002±5,940	0,104±0,068	0,067±0,003	0,136±0,000	0,463±0,019	0,663±0,042	0,658±0,051
Majčina dušica	51,823±7,423	50,105±5,264	49,818±2,699	0,125±0,000	0,110±0,006	0,118±0,002	0,601±0,014	0,582±0,116	0,507±0,059
Melisa	80,685±7,375	72,152±1,475	101,070±0,536	0,371±0,007	0,296±0,045	0,334±0,072	0,836±0,158	0,897±0,078	1,473±0,188
Menta	63,869±4,556	68,986±1,608	98,645±8,979	0,209±0,079	0,278±0,026	0,286±0,036	0,398±0,014	0,705±0,079	0,830±0,017

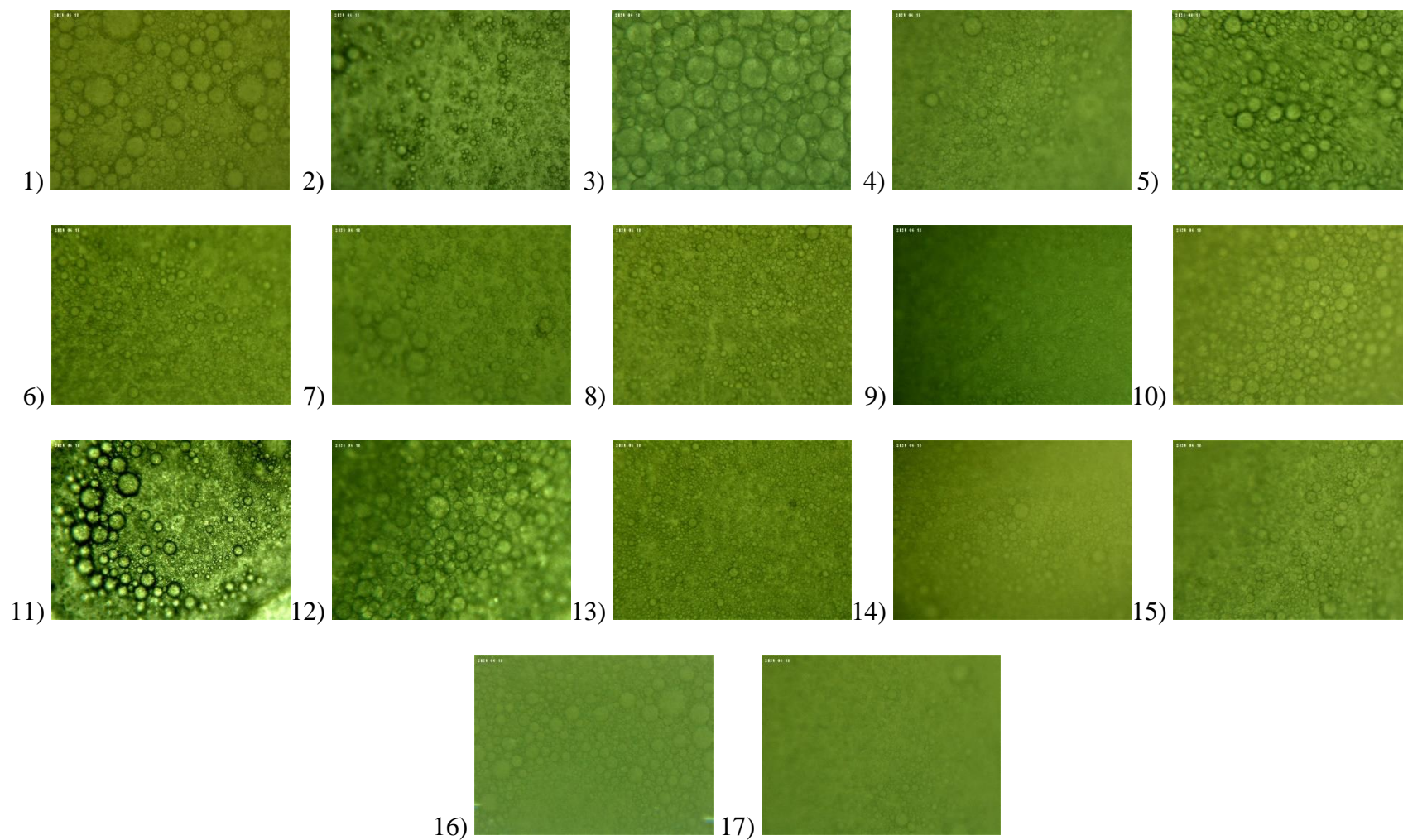
vrijednosti sa sva tri PEG emulgatora, dok zelen majčine dušice pokazuje niže vrijednosti nego u istraživanju.

4.6. ODREĐIVANJE PROSJEČNOG FERETOVOG PROMJERA KAPLJICA U EMULZIJAMA ULJE U VODENOM EKSTRAKTU BILJKE S DODATKOM EMULGATORA

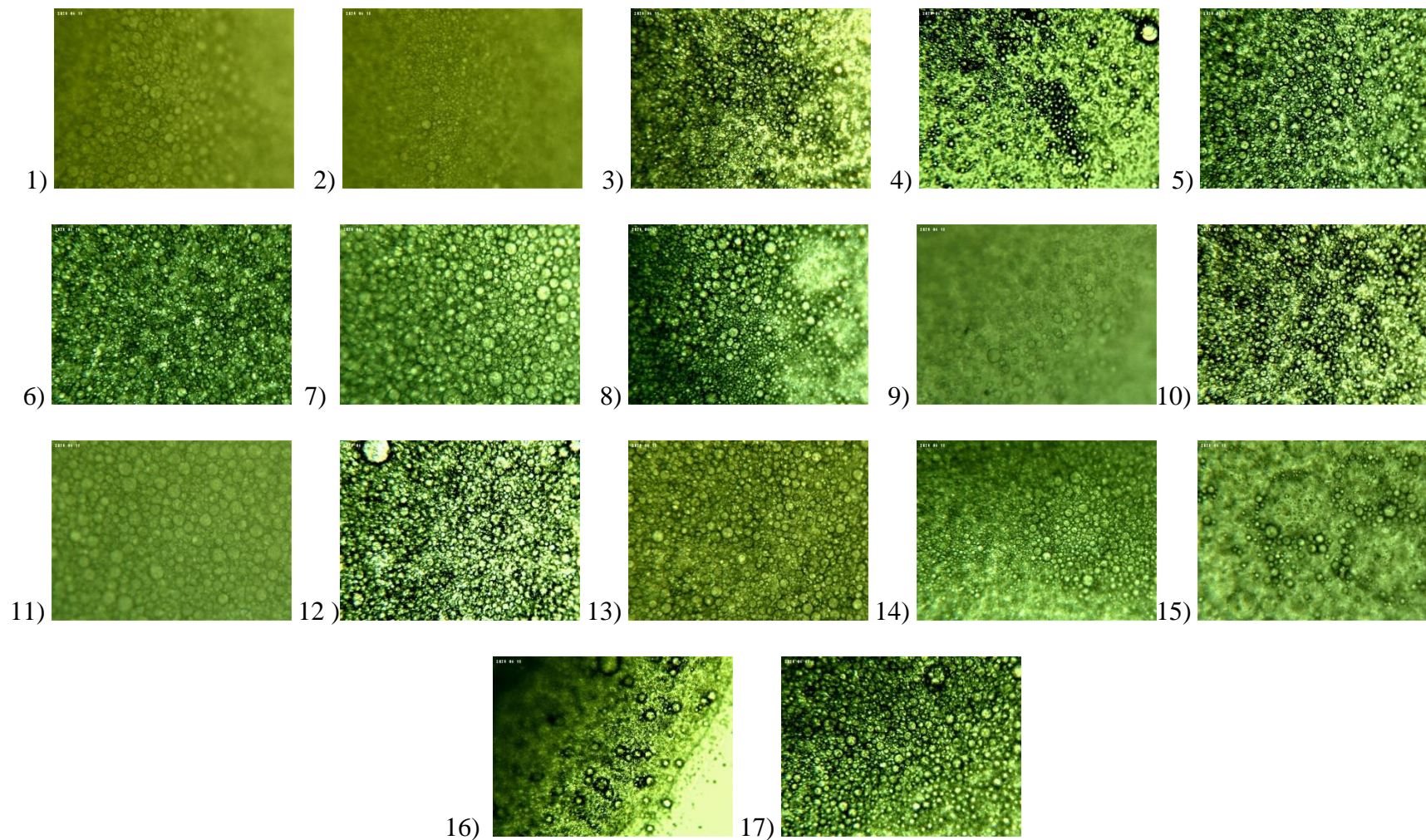
Stabilnost emulzija ovisi o viskoznosti, omjeru uljne i vodene faze, vrsti i koncentraciji emulgatora te o hidrodinamičkim uvjetima. Stabilne emulzije imaju mali udio disperzne faze u emulziji, dobru topljivost emulgatora u kontinuiranoj fazi te jednoliku veličinu kapljica u emulziji (Bendjaballah i sur., 2010). Budući da su mjerenjima dobivene kapljice koje su kružnog oblika, njihova veličina određena je mjerenjem prosječnog Feretovog promjera uz pomoć računalnog programa ImageJ. ImageJ ima ugrađenu opciju za analizu čestica, pri čemu nastaju izlazni parametri kao što su broj čestica, površina, opseg, minimalna i maksimalna vrijednost osi, Feretov promjer i mnogi drugi (Igathinathane i sur., 2008). Osim određivanja fizikalnih i kemijskih svojstava, svim pripremljenim emulzijama određena je veličina kapljica mjerenjem Feretovog promjera pomoću softvera ImageJ. Naime, odmah nakon završetka procesa emulgiranja slikani su mikroskopski prikazi slika s trenutnim stanjem kapljica emulzija ulje u vodenom ekstraktu biljaka uz dodatak emulgatora. Stoga je u radu moguće usporediti rezultate mjerenja dobivene vizualnom analizom slika (slike 14 – 21) te upotrebom softvera ImageJ (slike 22 i 23). Na slici 22 vidljiva je usporedba ovisnosti prosječnog Feretovog promjera o vrsti emulgatora pri različitim eksperimentalnim uvjetima za emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente. Najmanju vrijednost prosječnog Feretovog promjera imao je uzorak broj 11 (koncentracija emulgatora 2 %, udio uljne faze 35 %, brzina miješanja 25 000 rpm) s dodatkom PEG6000 emulgatora, a iznosio je 27,0957 μm . Najveću vrijednost prosječnog Feretovog promjera imao je uzorak broj 5 (koncentracija emulgatora 4 %, udio uljne faze 25 %, brzina miješanja 15 000 rpm) s dodatkom PEG1500 emulgatora, a iznosio je 69,0194 μm . Općenito gledajući, uzorci s dodanim PEG6000 emulgatorom imali su najmanje vrijednosti prosječnog Feretovog promjera, dok je najviše uzoraka s dodanim PEG1500 emulgatorom imalo najveće vrijednosti prosječnog Feretovog promjera. U rezultatima nije vidljiv određen trend rasta ili pada vrijednosti veličine Feretovog promjera s obrzirom na dodatak PEG emulgatora, da bi se mogao donijeti zaključak na koji način utječu na veličinu kapljica. Uspoređujući dobivene rezultate s vizualnom analizom slika, to se može i potvrditi.



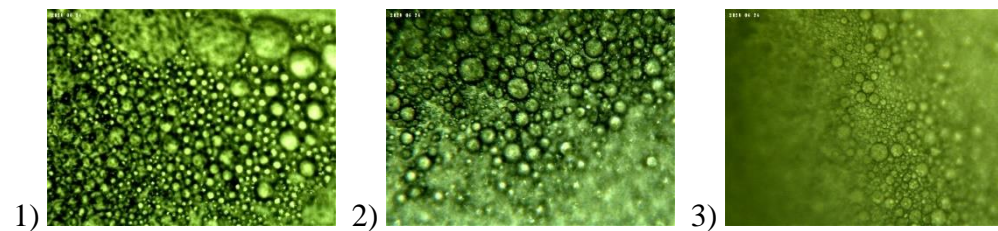
Slika 14. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora PEG1500, pri različitim eksperimentalnim uvjetima (eksperimenti od 1 do 17)



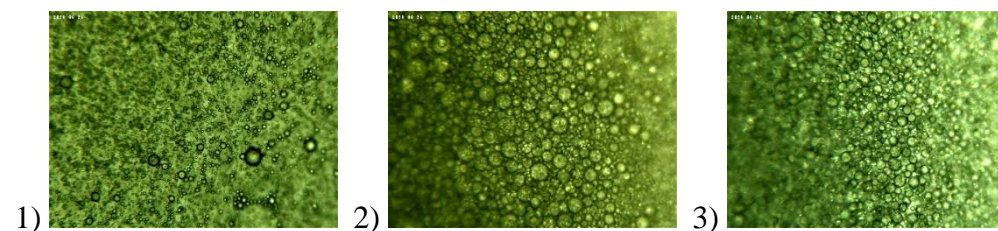
Slika 15. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora PEG6000, pri različitim eksperimentalnim uvjetima (eksperimenti od 1 do 17)



Slika 16. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente s dodatkom emulgatora PEG20000, pri različitim eksperimentalnim uvjetima (eksperimenti od 1 do 17)



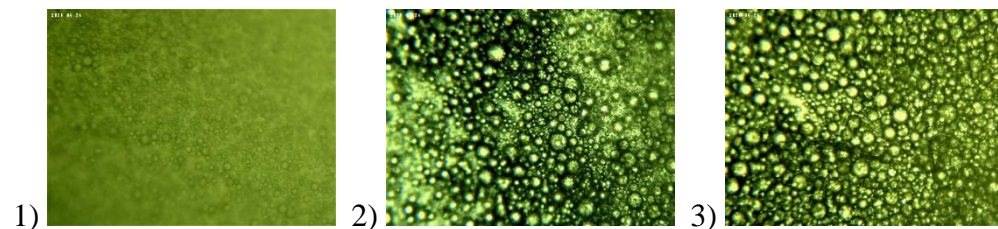
Slika 17. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu kadulje, s dodatkom emulgatora, pripremane pri optimalnim uvjetima – 1) PEG1500 2) PEG6000 3) PEG20000



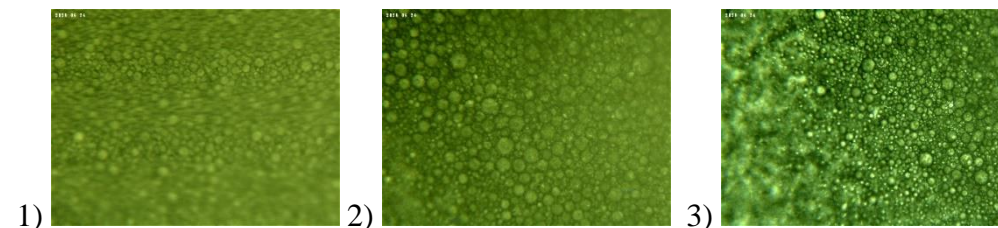
Slika 18. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu lavande, s dodatkom emulgatora, pripremane pri optimalnim uvjetima – 1) PEG1500 2) PEG6000 3) PEG20000



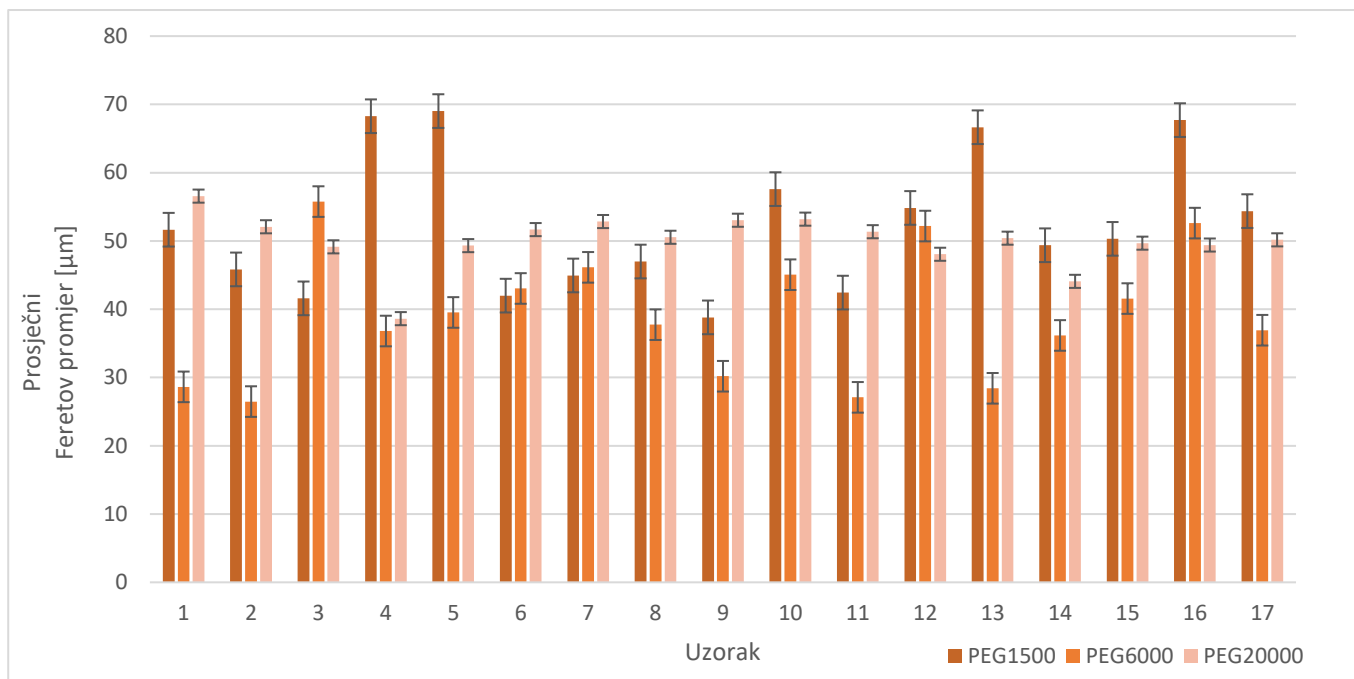
Slika 19. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu majčine dušice, s dodatkom emulgatora, pripremane pri optimalnim uvjetima – 1) PEG1500 2) PEG6000 3) PEG20000



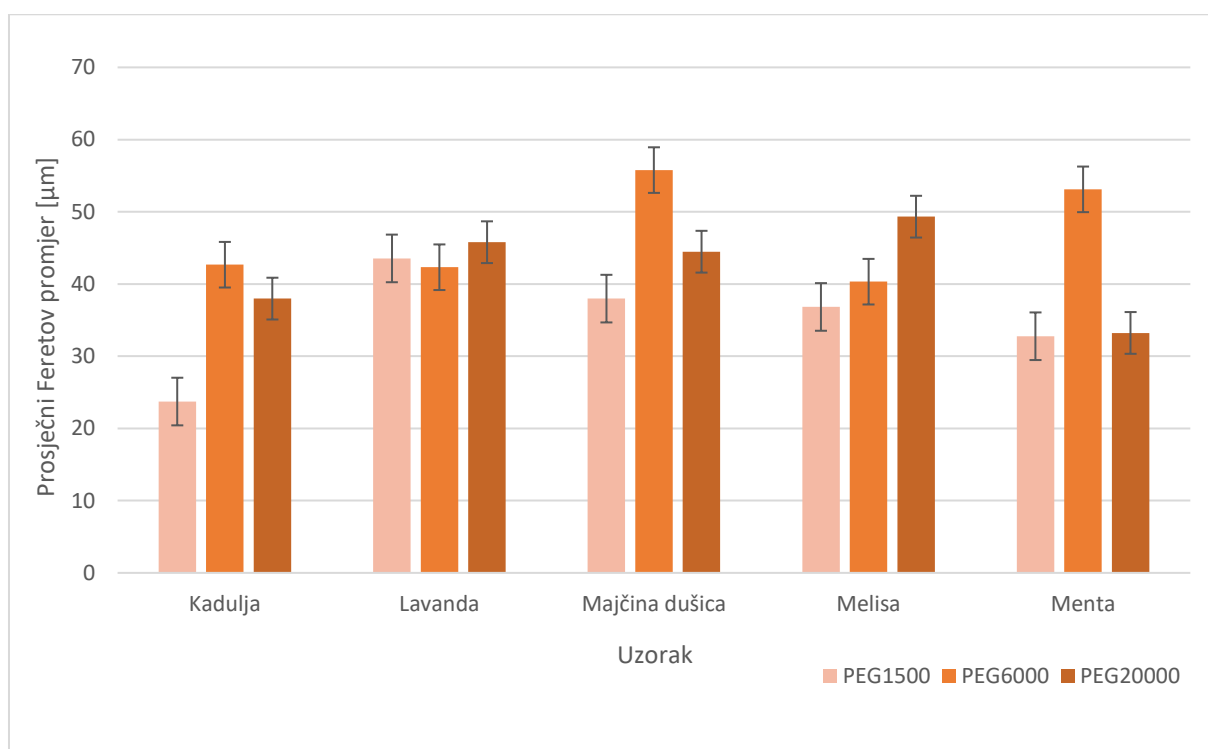
Slika 20. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu melise, s dodatkom emulgatora, pripremane pri optimalnim uvjetima – 1) PEG1500 2) PEG6000 3) PEG20000



Slika 21. Mikroskopski prikaz kapljica emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente, s dodatkom emulgatora, pripremane pri optimalnim uvjetima – 1) PEG1500 2) PEG6000 3) PEG20000



Slika 22. Usporedba ovisnosti prosječnog Feretovog promjera o vrsti emulgatora pri različitim eksperimentalnim uvjetima za emulzije ulje u vodenom ekstraktu mente



Slika 23. Usporedba ovisnosti prosječnog Feretovog promjera o vrsti emulgatora za emulzije ulje u vodenom ekstraktu kadulje, lavande, majčine dušice, melise i mente koje su pripremljene pri optimalnim uvjetima procesa emulgiranja

Kod mjerenja prosječnog Feretovog promjera emulzijama ulja u vodenom ekstraktu biljaka, izmjerene vrijednosti se kreću u rasponu od 23,724 μm do 55,775 μm . Na slici 23 vidljivo je da je samo kod emulzije melise vidljiv trend rasta prosječnog Feretovog promjera povećanjem molekulske mase emulgatora. Kadulja, majčina dušica i menta najmanje vrijednosti prosječnog Feretovog promjera imale su s dodatkom PEG1500 emulgatora, dok su najveće vrijednosti prosječnog Feretovog promjera zabilježene kod tih istih biljaka dodatkom PEG6000 emulgatora. Kod lavande su izmjerene vrijednosti veoma slične, dakle kapljice su dodatkom sva tri emulgatora bile sličnih veličina. Dakle, gledajući rezultate može se zaključiti da su vrijednosti prosječnih Feretovih promjera najmanje u emulzijama biljaka gdje je dodan emulgator PEG1500, što ukazuje da su te emulzije i najstabilnije.

Salimi i suradnici (2014) su ispitivali utjecaj koncentracije emulgatora, koncentracije likopena te brzinu miješanja na stabilnost emulzije prateći promjenu veličine kapljica. Veličina kapljica je važan pokazatelj stabilnosti emulzija, a može biti pod utjecajem metode homogenizacije, količine dispergirane i kontinuirane faze te viskoznosti. Što su kapljice emulzije manje, to je emulzija stabilnija. Uzorci su fotografirani digitalnim mikroskopom, a slike su kasnije obrađene u programu ImageJ. Analiza je pokazala da je najveći utjecaj na promjenu veličine kapljica imala koncentracija emulgatora, tj. veća koncentracija emulgatora rezultirala je smanjenjem veličine kapljica emulzija. Naime, veća koncentracija emulgatora omogućila je veću površinu između likopena i vanjske faze, što je dovelo do smanjenja veličine kapljica. Osim toga, povećanje brzine miješanja s 14000 na 18000 rpm imala je također značajan utjecaj na promjenu veličine kapljica. To može biti zbog utjecaja veće energije na međusobno sudaranje kapljica između rotora i statora uređaja.

5. ZAKLJUČCI

1. Optimalni uvjeti provedbe procesa emulgiranja vodenih ekstrakata mente s dodatkom tri PEG emulgatora dobiveni pomoću metode odzivnih površina su:
 - PEG1500 – koncentracija emulgatora 2,10 %, udio uljne faze 34,99 %, brzina miješanja 15250 rpm,
 - PEG6000 – koncentracija emulgatora 3,52 %, udio uljne faze 35 %, brzina miješanja 15000 rpm,
 - PEG20000 - koncentracija emulgatora 2,04 %, udio uljne faze 25,98 %, brzina miješanja 15900 rpm.
2. Najveća koncentracija polifenola u emulzijama ulja u vodenom ekstraktu mente izmjerena je pri uvjetima procesa emulgiranja: koncentracija emulgatora 4 %, udio uljne faze 25 %, brzina miješanja 35000 rpm, a ona je iznosila $75,918 \pm 3,725 \text{ mgGAE g}_{\text{s.t.}}^{-1}$.
3. Najveća koncentracija u emulzijama ulja u vodenim ekstraktima kadulje, lavande, majčine dušice, melise i mente izmjerena je u emulziji ulja u vodenom ekstraktu kadulje s dodatkom emulgatora PEG20000, a iznosila je $107,695 \pm 7,446 \text{ mgGAE g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Najmanja vrijednost izmjerena je za emulziju ulja u vodenom ekstraktu lavande s dodatkom emulgatora PEG20000, a iznosila je $42,022 \pm 0,02 \text{ mgGAE g}_{\text{s.t.}}^{-1}$.
4. Izmjerene vrijednosti zeta potencijala kod svih emulzija ulja u vodenom ekstraktu biljaka povećavale su se kako se povećala molekulska masa emulgatora, što ukazuje na pad stabilnosti emulzija. Dakle, dodatkom emulgatora PEG1500 emulzije su bile najstabilnije (izmjerene vrijednosti bile su u rasponu od -28,873 mV do -54,654 mV), dok su dodatkom emulgatora PEG20000 bile najmanje stabilne (izmjerene vrijednosti bile su u rasponu od -19,066 mV do -35,686 mV).
5. Obje metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP) pokazale su da najveću antioksidacijsku aktivnost ima emulzija ulja u vodenom ekstraktu melise i to

kod sva tri PEG emulgatora. Sveukupno gledajući, najmanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pokazala je emulzija ulja u vodenom ekstraktu lavande.

6. Za optimiranje procesa emulgiranja s dodanim PEG1500 emulgatorom brzina miješanja, koncentracija emulgatora i udio uljne faze nemaju statistički značajan utjecaj na zeta potencijal ($p > 0,05$). Dodatkom PEG6000 emulgatora, koncentracija emulgatora i udio uljne faze pokazuju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na zeta potencijal. Dodatkom PEG20000 emulgatora, koncentracija emulgatora pokazuje statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$) na vrijednosti zeta potencijala.
7. Kod emulzija vodenog ekstrakta mente nije primijećen značajan trend rasta ili pada veličine Feretovog promjera. Kod emulzija biljaka pripremljenih pri optimalnim uvjetima, jedino je kod emulzije lavande primijećen trend rasta veličine kapljica. Međutim, kod svih emulzija najmanje vrijednosti Feretovog promjera bile su kod dodatka emulgatora PEG1500, što ukazuje na najveću stabilnost tih emulzija.

6. LITERATURA

Adom, K. K., Sorrells, M. E., & Liu, R. H. (2003) Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7825–7834.

Ahn, J., Alford, A.R., Niemeyer, E. D., (2020) Variation in phenolic profiles and antioxidant properties among medicinal and culinary herbs of the Lamiaceae family. *J. Food Meas. Charact.* **14**, 1720-1732.

Ajatollahi, S. A., Shojaii, A., Kobarfard, F., Mohammadzadeh, M., Choudhary, M. I. (2009) Two flavones from *Salvia leiaefolia*. *Iran. J. Pharm. Sci.* **8**, 179-184.

Akbari, S., Nour, A. H. (2018) Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *Int. J. Sci. Res. Innov. Std.* **1**, 14-21.

Anonymous 1 (2017) <<https://willamettebotany.org/lamiaceae-mint-family/>> Pristupljeno 24. kolovoza 2020.

Anonymous 2 (2017) <https://aggie-horticulture.tamu.edu/travis/files/2017/08/E-561_growing_herbs_texas.pdf> Pristupljeno 2. rujna 2020.

Anonymous 3 (2014) <<https://herbalmateriamedica.wordpress.com/2014/08/02/lavandula-officinalis/>> Pristupljeno 25. kolovoza 2020.

Anonymous 4 (2007) <http://www.biolib.de/thome/band4/tafel_055.html> Pristupljeno 25. kolovoza 2020.

Anonymous 5 (2013) <<http://flipper.diff.org/app/items/info/5334>> Pristupljeno 27. kolovoza 2020.

Anonymous 6 (2019) <<https://www.krenizdravo.hr/prehrana/zdravi-recepti/sok-od-mente-savrseno-osvjezenje-i-ciscenje-organizma>> Pristupljeno 28. kolovoza 2020.

Anonymous7(2014)<<https://repozitorij.fazos.hr/islandora/object/pfos%3A631/datastream/PDF/view>> Pristupljeno 29. kolovoza 2020.

Anonymous 8 (2020) <<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/6c81068e-5e8f-449c-964c-825f6b1720bd/od-koloidnih-sustava-do-nanocestica.html>> Pristupljeno 25. kolovoza 2020.

AOAC (1995) Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., Artlington VA, USA.

Ardalani, H., Asli, D. E., Moradi, P. (2014) Physiological and morphological response of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) to prime application of salicylic hydroxamic acid. *Int. J. Biosci.* **5**, 406-412.

Asha, D., Lizzy, M. (2017) Chemical profiling of *Thymus vulgaris* L. using HPTLC. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **6**, 1017-1023.

Bačić, T., Sabo, M. (2007) Najvažnije medonosne biljke u Hrvatskoj, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.

Barbosa-Canovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Pablo, J. & Hong, Y. (2005). Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality, 1.izd., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Baş, D., Boyaci, I. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* **78**, 836-845.

Basch, E., Foppa, I., Liebowitz, R., Nelson, J., Smith, M., Sollars, D., Ulbricht, C. (2004) Lavander (*Lavandula angustifolia* Miller). *J. Herb. Pharmacother.* **4**, 63-78.

Bendjaballah, M., Canselier, J. P., Oumeddour, R. (2010) Optimization of oil-in-water emulsion stability: Experimental design, multiple light scattering, and acoustic attenuation spectroscopy. *J. Dispers. Sci. Technol.* **31**, 1260-1272.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965-977.

Boelens, M. (1995) Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. *Perfum. Flavor.* **20**, 23-51.

Brezoiu, A. M., Prundeanu, M., Berger, D., Deaconu, M., Matei, C., Oprea, O., Vasile, E., Negreanu-Pîrjol, T., Muntean, D., Danciu, C. (2020) Properties of *Salvia officinalis* L. And *Thymus Serpyllum* L. extracts free and embedded into mesopores of silica and titania nanomaterials. *Nanomaterials* **10**, 820.

Bulgariu, L., Bulgariu, D. (2008) Extraction of metal ions in aqueous polyethylene glycol-inorganic salt two-phase systems in the presence of inorganic extractants: Correlation between extraction behaviour and stability constants of extracted species. *J. Chromatogr. A* **1196-1197**, 117-124.

Cajner, H. (2011) *Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa* (Doctoral dissertation, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje).

Çakır, M. A., Icyer, N. C., Tornuk, F. (2020) Optimization of production parameters for fabrication of thymol-loaded chitosan nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **151**, 230-238.

Chelladurai, S. J. S., Murugan, K., Ray A. P., Upadhyaya, M., Narasimharaj, V., Gnanasekaran, S. (2020) Optimization of process parameters using response surface methodology: A review. *Mater. Today-Proc.* doi: 10.1016/j.matpr.2020.06.466.

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

Chen, T., Liu, Y., Zhu, Q. (2011) The conductivity Measurement of Polyethylene Glycol Dilaurate. *Open J. Adv. Mater. Res.* **317-319**, 718-722.

- Cirlini, M., Mena P., Tassotti, M., Herrlinger, K. A., Nieman, K. M., Dall'Asta, C., Rio, D. D. (2016) Phenolic and volatile composition of a dry spearmint (*Mentha spicata* L.) extract. *Molecules* **21**, 1007. doi:10.3390/molecules21081007.
- Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D., Čanadanović, V. (2008) Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J. Med. Food* **11**, 133-143.
- Dai, J., Mumper, R. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.
- Dauqan, E. M. A., Abdullah, A. (2017) Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* **5**, 17-22.
- Dent, M., Bursać Kovačević, D., Bosiljkov, T., Dragović-Uzelac, V. (2017) Polyphenolic composition and antioxidant capacity of indigenous wild dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Croat. Chem. Acta* **90**, 451-459.
- Duletić-Laušević, S., Alimpić, A., Pavlović, D., Marin, D. P., Lakušić, D. (2016) *Salvia officinalis* of different origins; Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content of extracts. *Agro Food Ind. Hi Tech.* **27**, 52-55.
- Erland, L., Mahmoud, S. (2016) Lavander (*Lavandula angustifolia*) oils. U: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, (Preedy V. R., ured.), Elsevier Academic Press, London/San Diego/Waltham, str. 501-508.
- Gallego, M. G., Gordon, M. H., Segovia, F. J., Skowrya, M., Almajano, M. P. (2013) Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions. *J. Am. Oil Chem.' Soc.* **90**, 1559-1568.
- 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.

Guiotto, E. N., Capitani, M. I., Nolasco, S. M., Tomas, M. C. (2015) Stability of Oil-in-Water Emulsions with Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and Chia (*Salvia hispanica* L.) By-Products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **93**, 133-143.

Güney, M., Oral, B., Karahan, N., Mungan, T., (2006) The effect of *Mentha spicata* Labiatae on uterine tissue in rats. *Toxicol. Ind. Health* **22**, 343-348.

Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., Shahlari, M. (2014) Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (*salvia*) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. *J. Tradit. Complement. Med.* **4**, 82-88.

Hegde, M. V., Zanzwar, A. A., Adekar, S. P. (2016) Omega-3 Fatty Acids; Keys to Nutritional Health, Springer, Maharashtra/Washington.

Igathinathane, C., Pordesimo, L. O., Columbus, E. P., Batchelor, W. D., Methuku, S. R. (2008) Shape identification and particles size distribution from basic shape parameters using ImageJ. *Comput. Electron. Agric.* **63**, 168-182.

ITIS (2018) ITIS – Integrated Taxonomic Information System, <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19109#null> Pristupljeno 15. kolovoza 2020.

Jakovljević, M., Jokić, S., Molnar, M., Jašić, M., Babić, J., Jukić, H., Banjari, I. (2019) Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L. Preparations. *Plants* **8**, 55. doi:10.3390/plants8030055.

Jebur, A. B., Mokhamer, M. H., El-Demerdash, F. M. (2016) A Review on Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Diabetes Mellitus. *Austin Endocrinol. Diabetes Case Rep.* **1**, 1006.

Kale, S. N., Deore, S. L. (2017) Emulsion micro emulsion and nano emulsion: A review. *Syst. Rev. Pharm.* **8**, 39-47.

Kamdem, J. P., Adeniran, A., Boligon A. A., Vargas Klimaczewski, C., Olalekan Elekofehinti, O., Hassan, W., Ibrahim, M., Pansera Waczuk, E., Francine Meinerz, D., Linde Athayde, M. (2013) Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Ind. Crops Prod.* **51**, 26-34.

Khan Shinwari, Z., Sultan, S., Mahmood, T. (2011) Molecular and Morphological Characterization of Selected *Mentha* Species. *Pak. J. Bot.* **43**, 1433-1436.

Kundu, P., Paul, V., Kumar, V., Mishra, I. M. (2015) Formulation development, modeling and optimization of emulsification process using evolving RSM coupled hybrid ANN-GA framework. *Chem. Eng. Res. Des.* **104**, 773-790.

Lamba, H., Sathish, K., Sabikhi, L. (2015) Double Emulsions: Emerging Delivery System for Plant Bioactives. *Food Bioproc. Tech.* **8**, 709-728.

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.

Le Man, H., Behera, S. K., Park, H. S. (2010) Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **7**, 157-164.

Lepur, A. (2017) Određivanje utjecaja procesnih parametara na veličinu i zeta potencijal čestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.* **13**, 757-772.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.* **93**, 47-56.

Matešić, N. (2019) Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih komponenata industrijske konoplje: optimiranje, kinetika i kemometrija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

McClements, D. J., Decker, E. A., Weiss, J. (2007) Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* **72**, 109-124.

Milevskaya, V. V., Temerdashev, Z. A., Butyl'skaya, T. S., Kiseleva, N. V. (2017) Determination of phenolic compounds in medicinal plants from the *Lamiaceae* family. *J. Anal. Chem.* **72**, 342-348.

Miraj, S., Rafieian-Kopaei, M., Kiani, S. (2017) *Melissa officinalis* L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **22**, 385-394.

Mocan, A., Babota, M., Pop A., Fizesan, I., Diuzheva, A., Locatelli, M., Carradori, S., Campestre, C., Menghini, L., Sisea, C. R., Sokovic, M., Zengin, G., Paltinean, R., Badarau, S., Vodnar, D. C., Crisan, G. (2020) Chemical constituents and biologic activities of sage species: A comparison between *Salvia officinalis* L., *S. glutinosa* L. and *S. transsylvanica* (Schur ex Griseb. & Schenk). *Schur. Antioxidants* **9**, 480. doi:10.3390/antiox9060480.

Moradi, M. T., Karimi, A., Alidadi, S., Hashemi, L. (2016) In Vitro Anti-adenovirus Activity, Antioxidant Potential and total Phenolic Compounds of *Melissa officinalis* L. (Lemon Balm) Extract. *Int. J. Pharmacogn.* **8**, 1471-1477.

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta* **713**, 8-18.

Mutalib, L. (2015) Comparison between conventional and modern methods for extraction of *Rosmarinus officinalis* leaves. *Zanco J. Med. Sci.* **19**, 1029-1034.

Naczka, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed.* **41**, 1523-1542.

- Nickavar, B., Abolhasani, L., Izadpanah, H. (2008) Alpha-amylase inhibitory activities of six salvia species. *Iran. J. Pharm. Res.* **7**, 297-303.
- Nieto, G. (2020) A review on applications and uses of thymus in the food industry. *Plants* **9**, 1-29.
- Ozturk, B., McClements, D. J. (2015) Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Curr. Opin. Food. Sci.* **7**, 1-6.
- Pfaff, S., Salopek, B. (2004) Primjena planiranja eksperimenata u oplemenjivanju mineralnih sirovina. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik.* **16**, str. 97-106.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.
- Rababah, T. M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., Yang, W. (2010) Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate. *J. Food Sci.* **75**, 626-632.
- Rabiei, Z., Rafieian-Kopaei, M., Mokhtari, S., Alibabaei, Z., Shahrani, M. (2014) The effect of pretreatment with different doses of *Lavandula officinalis* ethanolic extract on memory, learning and nociception. *Biomed. Aging Pathol.* **4**, 71-76.
- Radulescu, C., Stihi, C., Ilie, M., Lazurca, D., Gruia, R., Tudorel Olaru, O., Bute, O., Dulama, I. D., Stirbescu, R. M., Teodorescu, S., Florescu, M. (2017) Characterization of Phenolics in *Lavandula angustifolia*. *Anal. Lett.* **50**, 2839-2850.
- Raviadaran, R., Chandran, D., Shin, L. H., Manickam, S. (2018) Optimization of palm oil in water nano-emulsion with curcumin using microfluidizer and response surface methodology. *LWT - Food Sci. Technol.* **96**, 58-65.

Rios, G., Pazos, C., Coca, J. (2017) Zeta Potentials of Cutt mwu. Water Emulsions Influence Of Morgah'ic Salts, Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain.

Salimi, A., Maghsoudlou, Y., Jafari, S. M., Sadeghi Mahoonak, A., Kashaninejad, M., Ziaifar, A. M. (2014) Preparation of Lycopene Emulsions by Whey Protein Concentrate and Maltodextrin and Optimization by Response Surface Methodology. *J. Dispers. Sci. Technol.* **36**, 274-283.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Funct. Foods* **18**, 820-897.

Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7749-7759.

Shanaida, M., Golembiovska, O., Hudz, N., Wieczorek, P. P. (2018) Phenolic compounds of herbal infusions obtained from some species of the *Lamiaceae* family. *Curr. Issues Pharm. Medical Sci.* **31**, 194-199.

Sharafzadeh, S., Zare, M, (2011) Influence of growth regulators on growth and secondary metabolites of some medicinal plants from *Lamiaceae* family. *Adv. Environ. Biol.* **5**, 2296-2302.

Smith, M. (2003) Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A* **1000**, 3-27.

Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., De Feo, V. (2015) *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities Against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules* **20**, 14402-14424.

Sparr Eskilsson, C., Bjorklund, E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* **902**, 227-250.

Stangler Herodež, Š., Hadolin, M., Škerget, M., Knez, Ž. (2003) Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.* **80**, 275-282.

Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Félix, L. M., Schäfer, J., Santos, J. A., Bunzel, M., Nunes, F. M., Silva, A. M. (2020) Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: Comparison with endemic Iberian *Thymus* species. *Food Chem.* **331**, 127362. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127362.

Talle, B., Darvish, F., Mohammadi, A., Abbaszadeh, B., Rohami, M. (2012) Assessment of Relationship between Effective Traits on Yield and Compounds of Essential Oil and Morphological Traits of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Accessions Using Path Analysis and Canonical Correlation. *J. Basic. Appl. Sci. Res.* **2**, 3719-3723.

Traynor, M. P., Burke, R., Frías, J. M., Gaston, E., Barry-Ryan, C. (2013) Formation and stability of an oil in water emulsion containing lecithin, xanthan gum and sunflower oil. *Int. Food Res. J.* **20**, 2173-2181.

Triantaphyllou, K., Blekas, G., Boskou, D. (2001) Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **52**, 313-317.

Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., Pardossi, A. (2016) *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: Bioactivity, industrial prospects and role of "positive-stress". *Ind. Crop. Prod.* **83**, 241-254.

Tzima, K., Brunton, N., P., Rai, D. K. (2018) Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in lamiaceae plants - a review. *Plants* **7**. doi: 10.3390/plants7020025.

Ullah, A., Khan, A., Khan, I. (2015) Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm. J.* **24**, 547-553.

Vardanega, R., Santos, D. T., De Almedia, M. A. (2014) Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacogn. Rev.* **8**, 88-95.

Wang, Z., Zheng, P. (2017) Predicting settling performance of ANAMMOX granular sludge based on fractal dimensions. *Water Res.* **120**, 222-228.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerzys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* **105**, 940-949.

Yadikar, N., Bobakulov, K. M., Eshbakova, K. A., Aisa, H. A. (2017) Phenolic Compounds from *Lavandula angustifolia*. *Chem. Nat. Compd.* **53**, 562-564.

Yolmeh, M., Jafari, S. M. (2017) Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioproc. Tech.* **10**, 413-433.

Zhang, Q. V., Lin, L. G., Ye, W. C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin. Med.* **13**, 20. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.

Zhou, X. Y., Liu, R. L., Ma, X., Zhang, Z. Q. (2014) Polyethylene glycol as a novel solvent for extraction of crude polysaccharides from *Pericarpium Granati*. *Carbohydr. Polym.* **101**, 886-889.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Monika Ivanković

Ime i prezime studenta