

Funkcionalni potencijal dobričice (*Glechoma hederacea* L.) - karakterizacija sastava i bioloških učinaka, inkapsulacija i inkorporacija u čokoladu

Šeremet, Danijela

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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:159:240182>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Danijela Šeremet

**FUNKCIONALNI POTENCIJAL
DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) –
KARAKTERIZACIJA SASTAVA I
BIOLOŠKIH UČINAKA, INKAPSULACIJA
I INKORPORACIJA U ČOKOLADU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Danijela Šeremet

**FUNKCIONALNI POTENCIJAL
DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) –
KARAKTERIZACIJA SASTAVA I
BIOLOŠKIH UČINAKA, INKAPSULACIJA
I INKORPORACIJA U ČOKOLADU**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Danijela Šeremet

**FUNCTIONAL POTENTIAL OF GROUND
IVY (*Glechoma hederacea* L.) –
CHARACTERIZATION OF
COMPOSITION AND BIOLOGICAL
EFFECTS, ENCAPSULATION AND
INCORPORATION INTO CHOCOLATE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
PhD Draženka Komes, Full Professor

Zagreb, 2024.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 547.56:582.943:663.91:663.91(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

FUNKCIONALNI POTENCIJAL DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) – KARAKTERIZACIJA SASTAVA I BIOLOŠKIH UČINAKA, INKAPSULACIJA I INKORPORACIJA U ČOKOLADU

Danijela Šeremet, mag. ing. techn. aliment.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada te na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Sažetak: U istraživanju je provedeno određivanje bioaktivnog sastava i bioloških učinaka polifenolnog ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.) koji je u razvijenim inkapsuliranim dozirnim sustavima inkorporiran u inovativne formulacije funkcionalnih čokolada. U tu svrhu, integrirane su konvencionalne i inovativne tehnike ekstrakcije i inkapsulacije, *in vitro* i *in vivo* biološki test sustavi te odgovarajuća analitička metodologija. Kao najznačajniji polifenolni spojevi dobričice određeni su ružmarinska, klorogenska, kriptoklorogenska i kafeinska kiselina te rutin. Ispitivanja na staničnim linijama probavnog sustava nisu pokazala statistički značajan ($p > 0,05$) citotoksični učinak ekstrakta (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹), ali uočen je statistički značajan ($p < 0,05$) protektivni učinak na oksidacijska oštećenja modelnih makromolekula DNK i proteina. *In vivo* metodologijom utvrđen je statistički značajan ($p < 0,05$) genoprotektivni učinak svih koncentracija ekstrakta (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹) u ispitivanim organima (bubrezi, slezena i jetra) i krvi štakora, te statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje intenziteta peroksidacije lipida jetre i slezene, ovisno o koncentraciji. Sušenje raspršivanjem, provedeno uz djelomično hidroliziranu guar gumu kao osnovu binarnih sustava nosača s hidrolizatom kolagena, karboksimetil celulozom, mucinom, nutriziom i ksilanom, te liposomalna inkapsulacija omogućili su visoko zadržavanje (> 75 %) polifenolnih spojeva dobričice u inkapsuliranim sustavima. Dodatak obje vrste inkapsulata u čokolade rezultirao je bogatijim i raznovrsnijim bioaktivnim sastavom čokolada uz zadržavanje poželjnog profila taljenja čokolada, kao i karakterističnih teksturalnih i reoloških te atraktivnijih senzorskih svojstava, u odnosu na čokolade bez dodatka inkapsulata.

Broj stranica: 286

Broj slika: 96

Broj tablica: 42

Broj literaturnih navoda: 559

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biološka aktivnost; čokolade; dobričica; funkcionalna hrana; inkapsulacija; polifenoli

Datum obrane: 8. svibnja 2024.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Ksenija Durgo, redoviti profesor u trajnom zvanju
2. dr. sc. Krunoslav Žižek, redoviti profesor
3. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin, docent

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 547.56:582.943:663.91:663.91(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Food Technology

FUNCTIONAL POTENTIAL OF GROUND IVY (*Glechoma hederacea* L.) – CHARACTERIZATION OF COMPOSITION AND BIOLOGICAL EFFECTS, ENCAPSULATION AND INCORPORATION INTO CHOCOLATE

Danijela Šeremet, MSc

Thesis is performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, Faculty of Science University of Zagreb, Institute for Medical Research and Occupational Health and Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb.

Supervisor: PhD Draženka Komes, Full Professor

Abstract: In the present study, the characterization of the bioactive composition and biological effects of the ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) polyphenolic extract was performed, which was incorporated into innovative formulations of functional chocolates in the developed encapsulated dosage systems. For that purpose, conventional and innovative extraction techniques, encapsulation, biological *in vitro* and *in vivo* test systems, as well as suitable analytical methods, were integrated. Rosmarinic, chlorogenic, cryptochlorogenic and caffeic acids and rutin were identified as the main polyphenolic compounds of ground ivy. The study on the human cell lines of the digestive system showed no statistically significant ($p > 0.05$) cytotoxic effect of the extract (0.0125, 0.025, 0.075 and 0.25 mg mL⁻¹), but a statistically significant ($p < 0.05$) protective effect on oxidative damage to model macromolecules of DNA and protein was observed. Using the *in vivo* methodology, a statistically significant ($p < 0.05$) genoprotective effect of all extract concentrations (250, 500 and 1000 mg kg⁻¹) in the investigated organs (kidney, spleen and liver) and in the blood of rats, as well as a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the intensity of lipid peroxidation of liver and spleen, were observed. Spray drying, carried out using partially hydrolysed guar gum as the base of the binary carrier systems with collagen hydrolyzates, carboxymethyl cellulose, nutriose, mucin and xylan, and liposomal encapsulation enabled a high retention (> 75 %) of ground ivy polyphenolic compounds in the encapsulated systems. The addition of both types of encapsulation systems to chocolates resulted in richer and more diverse bioactive composition, while maintaining the desirable melting profile of the chocolates, as well as the characteristic textural and rheological and more attractive sensory properties, compared to chocolates without the addition of encapsulation systems.

Number of pages: 286

Number of figures: 96

Number of tables: 42

Number of references: 559

Number of supplements: 0

Original in: Croatian

Key words: biological activity; chocolates; encapsulation; functional food; ground ivy; polyphenols

Date of the thesis defense: 8th May 2024

Reviewers:

1. PhD Ksenija Durgo, Full Professor
2. PhD Krunoslav Žižek, Full Professor
3. PhD Aleksandra Vojvodić Cebin, Assistant Professor

Thesis deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes u sklopu projekta „Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda“ (IP-2019-04-5879) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo je temu ovog doktorskog rada pod naslovom „Funkcionalni potencijal dobričice (*Glechoma hederacea* L.) – karakterizacija sastava i bioloških učinaka, inkapsulacija i inkorporacija u čokoladu“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanjem mentora na sjednici održanoj 20. rujna 2023. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 19. prosinca 2023. godine.

Informacije o mentorici: dr. sc. Draženka Komes, redoviti profesor u trajnom zvanju

Prof. dr. sc. Draženka Komes redovita je profesorica u trajnom zvanju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je zaposlena od 1998. godine. Doktorirala je 2003. godine, a od 2008. godine pročelnica je Laboratorija za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda. U periodu od 2021. - 2023. godine bila je prodekanica za znanost i članica Vijeća biotehničkog područja, a tijekom 2021. godine i predsjednica Matičnog odbora za područje biotehničkih znanosti – polje poljoprivrede, šumarstva, drvne tehnologije, biotehnologije i prehrambene tehnologije i nutricionizma.

Izvodi nastavu na 14 kolegija na prijediplomskim i diplomskim studijima te na poslijediplomskom doktorskom i specijalističkom studiju, pri čemu je nositeljica 6 kolegija. Do sada su pod njezinim mentorstvom izrađena 72 diplomska rada i 54 završna rada te je bila mentorica 2 doktorske disertacije i 4 studentska rada koji su nagrađeni Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu. Stručno se usavršavala na Julius Kühn-Institute, Quedlinburg (Njemačka) (2004. i 2008. godine), a kao gostujući nastavnik boravila je na Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Faculty of Biotechnology and Food Science (Poljska) (akad. god. 2019./2020. te 2022./2023.), na University of Peradeniya, Faculty of Agriculture, Peradeniya (Šri Lanka) (akad. god. 2014./2015.), na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Splitu (akad. god. 2010./2011.) te na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu (akad. god 2008./2009.).

Kao rezultat znanstvenih istraživanja do sada je objavila 10 poglavlja u knjigama i 170 izvorna znanstvena rada, od čega je 115 znanstvenih radova indeksirano u WoSCC-SCI-Exp. Prema WOS-u h-indeks joj je 31, a citiranost 4006.

Prof. dr. sc. Draženka Komes bila je voditeljica znanstvenog projekta HRZZ-a koji je završio u veljači 2024. godine, a trenutno kao suradnica sudjeluje na jednom HRZZ projektu i na jednom Erasmus+ projektu. Do sada je vodila 9 znanstvenih projekata (radni paket FP7 projekta (FP7-KBBE-2009-3), projekt MZOŠ-a te hrvatsko-srpske, hrvatsko-kineske i hrvatsko-slovenske bilateralne projekte), a kao suradnica sudjelovala je na 11 znanstvenih projekata (pet europskih i šest nacionalnih).

Godine 2008. inicirala je organizaciju nacionalnog stručnog skupa „Funkcionalna hrana u Hrvatskoj“ koji se do danas kontinuirano održava svake godine, a 2013. godine pokrenula je i nacionalno studentsko natjecanje „Ecotrophelia Hrvatska“ i od tada je i članica Stručnog povjerenstva natjecanja „Ecotrophelia Europe“. Bila je članica Znanstvenih i Organizacijskih

odbora devet međunarodnih konferencija te je članica nekolicine stručnih društava. Na poziv Akreditacijske agencije Kosova 2022. godine bila je članicom ekspertnog tima u evaluaciji jednog studijskog programa na University of Peja “Haxhi Zeka”, a 2016. godine bila je članica Stručnog povjerenstva u postupku inicijalne akreditacije za obavljanje znanstvene djelatnosti na Sveučilištu u Splitu.

Članica je brojnih radnih skupina, povjerenstava i odbora, kako na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, tako i u Ministarstvu poljoprivrede, Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti te Hrvatskom društvu prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista. Predsjednica je Tehničke komisije Hrvatske gospodarske komore za dodjelu znaka „Hrvatska kvaliteta“, u kategoriji *Ostali proizvodi*.

Članica je Uredničkog odbora znanstvenog časopisa *Food Technology and Biotechnology*, znanstveno-stručnog časopisa *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* te znanstvenog časopisa *Croatian Journal of Food Science and Technology*.

Dobitnica je Državne nagrade za značajno znanstveno dostignuće za područje biotehničkih znanosti (2010.), Godišnje nagrade Hrvatske akademije tehničkih znanosti (2007.) i Godišnje nagrade Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu (2013.).



Sažetak

Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) je biljna vrsta koja je, unatoč dugoj tradiciji primjene u narodnoj medicini, nedovoljno istraženog sastava i ograničene komercijalne primjene. U ovome istraživanju, provedena je karakterizacija osnovnog kemijskog i bioaktivnog sastava dobričice s područja kontinentalne Hrvatske pri čemu su u cilju dobivanja maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti polifenolnih spojeva, optimirane tri tehnike: konvencionalna zagrijavanjem, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija subkritičnom vodom. Polifenolni sastav ekstrakata određen je spektrofotometrijskim i kromatografskim (LC-MS/MS i HPLC-PDA) metodama, a ekstraktu najizraženijeg bioaktivnog potencijala određeni su biološki učinci na *in vitro* i *in vivo* modelima. *In vitro* metodologija uključivala je određivanje citotoksičnog djelovanja ekstrakta, u rasponu koncentracija 0,0125 – 0,25 mg mL⁻¹, na humane stanične linije probavnog sustava (Cal27, HepG2, AGS i Caco-2) te na glavne predstavnike humane mikrobiote (*Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* i *Staphylococcus aureus*). Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta ispitano je određivanjem stupnja karbonilacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma i praćenjem indukcije slobodnih radikala u ranije navedenim staničnim linijama, dok je mogući genoprotektivni učinak ispitan na modelnoj DNK i također na staničnim linijama probavnog sustava. Daljnji tijek istraživanja uključivao je određivanje antigenotoksičnih i antioksidacijskih učinaka ekstrakta u *in vivo* uvjetima, praćenjem intenziteta karbonilacije proteina, peroksidacije lipida, aktivnosti superoksid dismutaze i koncentracije glutationa u bubrezima, jetri i slezeni Sprague Dawley štakora, tretiranih ekstraktom (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹) kroz 14 dana. U cilju očuvanja bioaktivnog potencijala ekstrakta dobričice, isti je inkapsuliran sušenjem raspršivanjem i liposomalnom tehnikom. Uz analizu fizikalno-kemijskih i morfoloških karakteristika inkapsulata, određena je učinkovitost inkapsulacije polifenola dobričice i kinetika otpuštanja istih u uvjetima simulirane probave u želucu i tankom crijevu. U svrhu usporedbe utjecaja ekstrakta dobričice i istog u inkapsuliranom obliku na parametre oksidacijskog stresa u *in vivo* uvjetima, Wistar štakori tretirani su liposomalnim inkapsulatima ekstrakta dobričice kroz 14 dana, nakon čega su se određivali isti parametri oksidacijskog stresa kao i za ekstrakt dobričice. Inkapsulirani sustavi ekstrakta dobričice, dobiveni sušenjem raspršivanjem i liposomalnom tehnikom, inkorporirani

su u matriks čokolada u udjelu od 2 i 4 % te su novoformuliranim čokoladama određena bioaktivna, teksturalna, reološka i senzorska svojstva te svojstva taljenja.

U sastavu dobričice određeni su najznačajniji polifenolni spojevi i to iz skupine fenolnih kiselina – ružmarinska, klorogenska, kafeinska i kriptoklorogenska kiselina, te flavonoid rutin. Ispitivanja na staničnim linijama probavnog sustava (CAL27, AGS, Caco-2 i HepG2) nisu pokazala statistički značajno ($p > 0,05$) citotoksično djelovanje ekstrakta u ispitivanim koncentracijama kroz 2 i 24 sata tretmana, ali uočeno je izraženo protektivno djelovanje na oksidacijska oštećenja modelnih makromolekula DNK i proteina, kao i bakteriostatsko djelovanje na patogene bakterije. Nadalje, u *in vivo* uvjetima, kod svake ispitivane koncentracija ekstrakta (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹) uočeno je prooksidacijsko djelovanje, barem na jednom od organa (bubrezi, jetra i slezena), neovisno o spolu, u vidu povećanja intenziteta karbonilacije proteina i smanjenja koncentracije glutationa. Unatoč tome, ekstrakt dobričice pokazao je izraženo antioksidacijsko djelovanje u vidu smanjenja intenziteta peroksidacije lipida slezene i jetre, kao i genoprotektivno djelovanje na DNK u bubrezima, jetri, slezeni i krvi štakora. Sušenje raspršivanjem i liposomalna inkapsulacija omogućili su visoko zadržavanje (> 75 %) polifenolnih spojeva dobričice u inkapsuliranim sustavima. Liposomalna inkapsulacija rezultirala je kontinuiranim i kontroliranim otpuštanjem ružmarinske kiseline tijekom simulirane probave u želucu i tankom crijevu, dok je kod inkapsulata sušenih raspršivanjem, kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva značajno ovisila o sastavu nosača inkapsulata. Na temelju dobivenih rezultata u ovome radu, predlaže se korištenje binarnih sustava nosača od kojih jedan polimer posjeduje izraženiji hidrofoban karakter, a u ovome istraživanju, to je bila karboksimetil celuloza. Nadalje, liposomalni inkapsulati ekstrakta dobričice su u *in vivo* uvjetima pokazali izraženije antioksidacijsko djelovanje, u odnosu na slobodni, neinkapsulirani oblik ekstrakta iste koncentracije (250 mg kg⁻¹), na intenzitet peroksidacije lipida bubrega i jetre ženskih štakora, dok su oba oblika uzrokovala povećanje intenziteta karbonilacije proteina u bubrezima, slezeni i jetri kod oba spola. Inkorporacijom inkapsulata ekstrakta dobričice u matriks čokolada, iste su uspješno obogaćene polifenolnim spojevima dobričice uz zadržavanje karakterističnog profila taljenja čokolada, svojstvenih teksturalnih i reoloških svojstava te atraktivnijih senzorskih svojstava, u odnosu na čokolade bez inkapsulata.

Ključne riječi: biološka aktivnost; čokolade; dobričica; funkcionalna hrana; inkapsulacija; polifenoli



Summary

Ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) is a plant species that, despite a long tradition of use in folk medicine, has an insufficiently studied composition and limited commercial use. In the present study, the chemical and bioactive composition of ground ivy from the continental region of Croatia was characterized. To achieve maximum extraction efficiency of the polyphenolic compounds, three techniques were optimized: conventional heat-assisted extraction, microwave-assisted extraction and subcritical water extraction. The polyphenolic composition of the extracts was determined by spectrophotometric and chromatographic (LC-MS/MS and HPLC-PDA) methods and the biological effects of the extract with the most pronounced bioactive potential were determined using *in vitro* and *in vivo* models. The *in vitro* methodology included the determination of the cytotoxic effect of the extract in the concentration range of 0.0125 - 0.25 mg mL⁻¹ on human cell lines of the digestive system (Cal27, HepG2, AGS and Caco-2) and on the main representatives of the human microbiota (*Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*). The antioxidant activity of the extract was tested by determining the degree of carbonylation on the model protein albumin from bovine serum and monitoring the induction of free radicals in the aforementioned cell lines, while the possible genoprotective effect was tested on model DNA and also on cell lines of the digestive system. Further studies included the determination of the antigenotoxic and antioxidant effects of the extract *in vivo* by monitoring the intensity of protein carbonylation, lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and glutathione concentration in the kidney, liver and spleen of Sprague Dawley rats treated with the extract (250, 500 and 1000 mg kg⁻¹) within the period of 14 days. To preserve the bioactive potential of the ground ivy extract, it was encapsulated by spray drying and the liposomal technique. In addition to physicochemical and morphological analyses, the efficacy of encapsulation of ground ivy polyphenols and the kinetics of their release under conditions of simulated digestion in the stomach and small intestine were determined. To compare the effect of ground ivy extract with its encapsulated form on oxidative stress parameters *in vivo*, Wistar rats were treated with liposomal encapsulates of ground ivy extract for 14 days, after which the same oxidative stress parameters were determined as for ground ivy extract. Encapsulated systems of ground ivy extract obtained by spray drying and liposomal technique were incorporated into the chocolate matrix at 2 and

4 % and the bioactive, textural, rheological, sensory and melting properties of the formulated chocolates were determined.

The most important polyphenolic compounds from the group of phenolic acids were rosmarinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and cryptochlorogenic acid, as well as the flavonoid rutin. The analysis on cell lines of the digestive system (CAL27, AGS, Caco-2 and HepG2) showed no statistically significant ($p>0.05$) cytotoxic effect of the extract at the tested concentrations during the 2- and 24-hour treatment, but a pronounced protective effect on oxidative damage of model DNA and protein macromolecules, as well as a bacteriostatic effect on pathogenic bacteria, was observed. Moreover, under *in vivo* conditions, at each concentration of the extract studied (250, 500 and 1000 mg kg⁻¹), a prooxidant effect was observed, at least on one of the organs (kidney, liver and spleen), regardless of gender, in the form of an increase in the intensity of carbonylation of proteins and a decrease in glutathione concentration. Nevertheless, ground ivy extract showed pronounced antioxidant activity in the reduction of the lipid peroxidation intensity in the spleen and liver and a genoprotective effect on DNA in the kidney, liver, spleen and blood of rats.

Spray drying and liposomal encapsulation enabled a high retention (> 75 %) of the polyphenolic compounds of ground ivy in encapsulated systems. Liposomal encapsulation led to a continuous and controlled release of rosmarinic acid during simulated digestion in the stomach and small intestine, whereas in spray-dried systems, the release kinetics of the polyphenolic compounds depended significantly on the composition of the encapsulated carrier. Based on the obtained results, this study suggests the use of binary carrier systems, one of which has a more pronounced hydrophobic character, and in the present study, it was carboxymethyl cellulose. Moreover, the liposomal encapsulated ground ivy extract showed a more pronounced antioxidant activity *in vivo* compared to the free, non-encapsulated form of the extract at the same concentration (250 mg kg⁻¹) on the intensity of lipid peroxidation of the kidney and liver of female rats, while both forms caused an increased intensity of protein carbonylation in kidney, spleen and liver. By incorporating encapsulates of ground ivy extract into the chocolate matrix, these were successfully enriched with polyphenolic compounds of ground ivy, while maintaining the characteristic melting profile of chocolates, the typical textural and rheological properties and the more attractive sensory properties, compared to chocolates without encapsulates.

Keywords: biological activity; chocolates; ground ivy; functional food; encapsulation; polyphenols

Prvo i veliko HVALA mentorici, prof. dr. sc. Draženki Komes, na danoj prilici da ostvarim svoje snove i zaplivan u znanstvene vode. Hvala na svakoj lijepoj riječi, savjetima i strpljenju tijekom izrade ove disertacije koja je plod našeg zajedničkog rada i truda. Hvala i na divnom radnom okruženju! Čeka nas još puno zajedničkih uspjeha.

Ne znam koliko puta bih trebala reći hvala da bude dovoljno za prof. dr. sc. Kseniju Durgo. Pokušat ću s jednim velikim HVALA za sve što ste učinili za mene, na iskazanoj dobroti i nesebičnom dijeljenju znanja.

Hvala prvoj i najdražoj susjedi za radnim stolom, Ani Manduri Jarić, mag. ing. (uskoro dr. sc.), na apsolutno svemu. Previše je toga da nabrajam. Tijekom izrade naših doktorata nastalo je jedno divno prijateljstvo i to je naš najvrjedniji rezultat.

Moja najdraža PBF-ovka, dr. sc. Matea Habuš, hvala što si bila tu i što si još uvijek tu, bez obzira na sve. Nezamjenjiva si.

Hvala doc. dr. sc. Aleksandri Vojvodić Cebin i dr. sc. Ani Huđek Turković na pomoći, savjetima, podršci i prijateljstvu.

Hvala prof. dr. sc. Krunoslavu Žižeku, prof. dr. sc. Vesni Benković, Suzani Džambić, dr. sc. Vedranu Miceku, dr. sc. Dyani Odeh, dr. sc. Vedranu Balti, dr. sc. Anici Horvat Knežević, dr. sc. Predragu Petroviću, prof. dr. sc. Domagoju Vrsaljku, izv. prof. dr. sc. Moniki Kovačević i Branimiru Valenčaku, dipl. ing., na pomoći pruženoj tijekom eksperimenata i analiza.

Hvala i svima vama koji ste mi ustupili svoje uređaje i posuđivali kemikalije. Budite uvijek kolegijalni jer dobro se dobrim vraća.

I moji šćeri na kraju,
najveće HVALA ikad je za najbolje roditelje i najbolju sestru na svijetu!

Mama i tata, znam da sve što činite, činite za sestru i mene. Mi vas volimo i ovo je za vas!



Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	3
2.1. Uporaba ljekovitih biljaka kroz povijest i danas	3
2.2. Uporaba biljaka na području Republike Hrvatske.....	6
2.3. Dobričica (<i>Glechoma hederacea</i> L.).....	8
2.3.1. Bioaktivni spojevi dobričice	9
2.3.2. Biološki učinci dobričice.....	14
2.3.3. Uporaba dobričice.....	17
2.4. Inkapsulacija bioaktivnih spojeva	20
2.4.1. Metabolizam polifenola i utjecaj inkapsulacije na njihovu bioraspoloživost.....	25
2.4.2. Sušenje raspršivanjem.....	29
2.4.2.1. Nosači u sušenju raspršivanjem	34
2.4.2.2. Guar guma.....	35
2.4.3. Liposomalna inkapsulacija	38
2.5. Kakaova zrna i proizvodnja čokolade	42
2.5.1. Proizvodnja kakaovih zrna	42
2.5.2. Izazovi u dostatnoj proizvodnji kakaovih zrna	45
2.5.3. Čokolada kao funkcionalna hrana.....	49
2.5.4. Proizvodnja čokolade – formiranje arome i stabilnost polifenola.....	56
2.5.5. Nove tehnologije u proizvodnji čokolade i trendovi na tržištu	60
3. Eksperimentalni dio	63
3.1. Materijal.....	64
3.1.1. Uzorci.....	64
3.1.2. Biološki test sustavi	65
3.1.3. Sirovine za proizvodnju čokolade.....	67
3.1.4. Kemikalije	67
3.1.5. Oprema.....	71
3.2. Metode	74
3.2.1. Određivanje kemijskog sastava uzoraka dobričice.....	74
3.2.2. Određivanje polifenolnog sastava uzoraka dobričice	74
3.2.2.1. Optimiranje pojedinih tehnika ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice.....	74
3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola	75
3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	75
3.2.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	75
3.2.2.5. Određivanje udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-PDA)	76
3.2.2.6. Analiza ekstrakata blisko infracrvenom (NIR) spektroskopijom	80
3.2.3. Priprema ekstrakta dobričice za <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> analize	80

3.2.4. <i>In vitro</i> analize ekstrakta dobričice	80
3.2.4.1. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama	80
3.2.4.2. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na predstavnike humane mikroflore	81
3.2.4.3. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama	81
3.2.4.4. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta dobričice na modelnoj DNK i staničnom genetičkom materijalu	82
3.2.4.5. Određivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma	83
3.2.5. <i>In vivo</i> analize ekstrakta dobričice	84
3.2.5.1. Obrada pokusnih štakora	84
3.2.5.2. Određivanje hematoloških i biokemijskih parametara krvi štakora	84
3.2.5.3. Priprema homogenata organa za analize	85
3.2.5.4. Određivanje udjela proteina u homogenatima organa	85
3.2.5.5. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije u organima	86
3.2.5.6. Određivanje koncentracije karboniliranih proteina u organima	86
3.2.5.7. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa u organima	87
3.2.5.8. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze u organima	87
3.2.5.9. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta dobričice na organima i krvi	87
3.2.6. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem	88
3.2.6.1. Provođenje termalnih analiza polimera	88
3.2.6.2. Priprema otopina nosača u ekstraktu	88
3.2.6.3. Određivanje viskoznosti otopina nosača	89
3.2.6.4. Provođenje sušenja raspršivanjem	89
3.2.6.5. Određivanje prinosa sušenja raspršivanjem	89
3.2.6.6. Određivanje suhe tvari inkapsulata	89
3.2.6.7. Određivanje močivosti inkapsulata	89
3.2.6.8. Određivanje kontaktnog kuta vode inkapsulata	90
3.2.6.9. Određivanje nasipne gustoće inkapsulata	90
3.2.6.10. Analiza inkapsulata pretražnom elektronskom mikroskopijom	90
3.2.6.11. Određivanje zeta potencijala inkapsulata	90
3.2.6.12. Analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Furierovom transformacijom (FT-IR)	90
3.2.6.13. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti polifenolnih spojeva	91
3.2.6.14. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave	91
3.2.7. Liposomalna inkapsulacija	91
3.2.7.1. Određivanje fizikalnih parametara liposoma	92
3.2.7.2. Određivanje morfoloških karakteristika liposoma	92
3.2.7.3. Analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Furierovom transformacijom (FT-IR)	92
3.2.7.4. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti	92
3.2.7.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta TBARS metodom	93

3.2.7.6. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave.....	93
3.2.8. <i>In vivo</i> analize inkapsulata dobričice.....	93
3.2.8.1. Obrada pokusnih štakora	94
3.2.8.2. Određivanje parametara oksidacijskog stresa	94
3.2.9. Formulacija čokolada uz inkorporaciju inkapsulata dobričice	94
3.2.9.1. Određivanje udjela čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu	96
3.2.9.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada	96
3.2.9.3. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave.....	96
3.2.9.4. Određivanje reoloških svojstva čokolada	96
3.2.9.5. Određivanje svojstva taljenja čokolada	97
3.2.9.6. Određivanje teksturalnih svojstva čokolada	97
3.2.9.7. Senzorska analiza čokolada	97
3.2.10. Statistička obrada rezultata	97
4. Rezultati	98
4.1. Karakterizacija kemijskog sastava dobričice	98
4.2. Optimiranje pojedinih tehnika ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice	101
4.2.1. Konvencionalna tehnika ekstrakcije.....	101
4.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	107
4.2.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom	112
4.3. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakata dobričice	117
4.4. Karakterizacija ekstrakata NIR spektroskopijom.....	119
4.5. Karakterizacija bioloških učinaka ekstrakta dobričice <i>in vitro</i>	120
4.5.1. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuirane humane stanične linije	121
4.5.2. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na predstavnike humane mikroflore	123
4.5.3. Određivanje antioksidacijskog i prooksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama	123
4.5.4. Određivanje antioksidacijskog i prooksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na modelnoj DNK ...	125
4.5.5. Određivanje genotoksičnog i genoprotektivnog učinka ekstrakta dobričice na staničnom genetičkom materijalu.....	127
4.5.6. Određivanje antioksidacijskog i prooksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na albuminu iz goveđeg seruma	130
4.6. Karakterizacija bioloških učinaka ekstrakta dobričice <i>in vivo</i>	130
4.6.1. Određivanje udjela organa u masi štakora	131
4.6.2. Određivanje udjela proteina u homogenatima organa	132
4.6.3. Određivanje biokemijskih i hematoloških parametara krvi	132
4.6.4. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na koncentraciju karboniliranih proteina organa.....	136
4.6.5. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na intenzitet peroksidacije lipida organa	138
4.6.6. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na koncentraciju glutaciona u organima.....	139
4.6.7. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na aktivnost superoksid dismutaze u organima.....	141

4.6.8. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na parametre genotoksičnosti u krvi i organima	142
4.7. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem	147
4.7.1. Određivanje toplinskih svojstava nosača	147
4.7.2. Određivanje viskoznosti otopina nosača	149
4.7.3. Određivanje prinosa i fizikalnih parametara inkapsulata	152
4.7.4. Određivanje funkcionalnih veza FT-IR spektroskopijom	155
4.7.5. Određivanje bioaktivnih svojstava inkapsulata	157
4.8. Liposomalna inkapsulacija	160
4.8.1. Određivanje fizikalnih i morfoloških svojstava inkapsulata	160
4.8.2. Određivanje funkcionalnih veza FT-IR spektroskopijom	162
4.8.3. Određivanje bioaktivnih svojstava inkapsulata	162
4.9. Karakterizacija bioloških učinaka liposomalnog ekstrakta dobričice <i>in vivo</i>	165
4.9.1. Određivanje udjela proteina u homogenatima organa	165
4.9.2. Određivanje parametara oksidacijskog stresa u organima	165
4.10. Formulacija funkcionalnih čokolada	169
4.10.1. Određivanje udjela čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu	169
4.10.2. Određivanje bioaktivnog sastava čokolada	170
4.10.3. Određivanje reoloških svojstava čokolada	172
4.10.4. Određivanje svojstava taljenja i tvrdoće čokolada	174
4.10.5. Određivanje senzorskih svojstava čokolada	176
5. Rasprava	178
5.1. Kemijski sastav uzoraka dobričice	179
5.2. Optimiranje pojedinih tehnika ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice	182
5.3. Polifenolni sastav uzoraka dobričice	185
5.4. Karakterizacija ekstrakata NIR spektroskopijom	188
5.5. <i>In vitro</i> biološki učinci ekstrakta dobričice	189
5.5.1. Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta dobričice na kontinuirane humane stanične linije	189
5.5.2. Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta dobričice na predstavnike humane mikroflore	191
5.5.3. Antioksidacijski i prooksidacijski učinak ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama	193
5.5.4. Antioksidacijski i prooksidacijski učinak ekstrakta dobričice na modelnoj DNK	194
5.5.5. Genotoksični i genoprotektivni učinak ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama	195
5.5.6. Antioksidacijski i prooksidacijski učinak ekstrakta dobričice na albuminu iz goveđeg seruma	196
5.6. <i>In vivo</i> biološki učinci ekstrakta dobričice	197
5.6.1. Udjel organa u masi štakora	197
5.6.2. Utjecaj ekstrakta dobričice na biokemijske i hematološke parametre krvi štakora	198
5.6.3. Utjecaj ekstrakta dobričice na koncentraciju karboniliranih proteina bubrega, slezene i jetre	199
5.6.4. Utjecaj ekstrakta dobričice na intenzitet peroksidacije lipida bubrega, slezene i jetre	200
5.6.5. Utjecaj ekstrakta dobričice na koncentraciju ukupnog glutationa bubrega, slezene i jetre	201
5.6.6. Utjecaj ekstrakta dobričice na aktivnost superoksid dismutaze bubrega, slezene i jetre	203

5.6.7. Utjecaj ekstrakta dobričice na parametre genotoksičnosti u krvi i organima.....	203
5.7. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem	205
5.7.1. Toplinske analize polimera.....	205
5.7.2. Viskoznost otopina nosača za sušenje raspršivanjem.....	206
5.7.3. Fizikalna i morfološka svojstva inkapsulata	206
5.7.4. FT-IR analiza nosača, ekstrakta i inkapsulata.....	210
5.7.5. Bioaktivna svojstva inkapsulata.....	211
5.8. Liposomalna inkapsulacija	214
5.8.1. Fizikalna i morfološka svojstva inkapsulata	214
5.8.2. FT-IR analiza liposoma, ekstrakta i liposomalnih inkapsulata	215
5.8.3. Bioaktivna svojstva inkapsulata.....	216
5.9. <i>In vivo</i> biološki učinci liposomalnog ekstrakta dobričice.....	218
5.10. Formulacija funkcionalnih čokolada	221
5.10.1. Udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu.....	221
5.10.2. Bioaktivni sastav čokolada	222
5.10.3. Reološka svojstva čokolada.....	224
5.10.4. Svojstva taljenja i teksturalna svojstva čokolada	226
5.10.5. Senzorska svojstva čokolada	228
6. Zaključci.....	231
7. Literatura	233

1. Uvod

Hrvatska flora treća je najbogatija u Europi, poslije slovenske i albanske, prema broju vrsta i pripadne površine, te shodno tome postoji i duga povijest uporabe različitih biljaka, posebice u narodnoj medicini. Premda je u novije vrijeme veliki broj znanstvenih istraživanja usmjeren prema uvjetima uzgoja, kemijskom i bioaktivnom sastavu različitih ljekovitih, aromatskih i začinskih biljaka, još uvijek postoji veliki broj biljaka čiji potencijal, iako se od davnina tradicionalno koriste u narodnoj medicini, nije dovoljno istražen i iskorišten. Među tim biljkama je i dobričica (*Glechoma hederacea* L.) iz porodice usnača (Lamiaceae) koja se zbog široko rasprostranjene šumske vegetacije, koja pogoduje njezinom rastu, može naći na području kontinentalne Hrvatske, kao i ostatku Europe te Azije i SAD-a. U narodnoj medicini koristi se u obliku infuzija za ublažavanje dišnih i probavnih tegoba, kao diuretik i stimulans, a i topikalno za liječenje kožnih iritacija, ali nedostaju znanstveno potvrđeni podaci za navedene učinke. Trenutno je u bazi podataka Web of Science (WoS, 2024) dostupno samo 16 znanstvenih radova na temu bioloških učinaka dobričice.

Biološki učinci dobričice, a i općenito tradicionalnih biljnih vrsta, pripisuju se različitim bioaktivnim spojevima u njihovom sastavu, među kojima se naročito istražuju polifenolni spojevi. Polifenolni spojevi su široko rasprostranjena grupa sekundarnih biljnih metabolita s nekoliko tisuća poznatih kemijskih struktura, i premda su njihovi *in vitro* antioksidacijski i protuupalni učinci dokazani, isti nisu uvijek potvrđeni na *in vivo* modelima ili su često proturječni. Ova nedosljednost između *in vitro* i *in vivo* istraživanja predstavlja nove izazove i otvara teme budućih istraživanja, osobito one povezane s ulogom polifenola u smanjenju rizika od razvoja mnogih degenerativnih i kroničnih bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom. Naime, slobodni ili jednostavni konjugati polifenolnih spojeva koji su poznati kao najsnažniji antioksidansi, apsorbiraju se u gornjem dijelu probavnog sustava i njihova je bioraspoloživost vrlo niska u usporedbi s drugim antioksidansima. Stoga, u svrhu što učinkovitije ciljane isporuke polifenola, a i drugih bioaktivnih spojeva u organizmu, prehrambena industrija intenzivno istražuje mogućnosti unaprjeđenja formulacija funkcionalne hrane dizajniranjem novih matriksa za povećanje stabilnosti, bioaktivnosti i bioraspoloživosti aktivnih sastojaka. U tom kontekstu posebno je zanimljiva inkapsulacija polifenolnih spojeva, jer osim zaštite od vanjskih nepovoljnih uvjeta, omogućuje ciljanu isporuku aktivnog sastojka u odgovarajući segment probavnog sustava. Inkapsulacija je tehnika u kojoj se materijal ugrađuje unutar ili prevlači sustavom nosača kako bi se formirale čestice različitih veličina. Do danas je razvijeno



nekoliko desetaka tehnika inkapsulacije, među kojima se sušenje raspršivanjem pokazalo najpogodnijom za dobivanje čvrstih ili polučvrstih uzoraka iz tekućih materijala, a ujedno i najekonomičnijom zbog niskih operativnih troškova. S druge strane, među novijim tehnikama je liposomalna inkapsulacija čija su velika prednost amfifilna svojstva liposoma koja pogoduju inkapsulaciji i hidrofилnih i hidrofobnih spojeva. Međutim, iako je područje liposomologije pokrenuto 60-ih godina prošlog stoljeća kada je i objavljena prva struktura liposoma, potencijal primjene ove tehnike u prehrambenoj industriji još uvijek je nedovoljno istražen.

U potrazi za odgovarajućim matriksom za obogaćivanje funkcionalnim sastojcima, čokolada je dobar izbor budući da je omiljeni proizvod svih generacija potrošača. Tržište čokoladnih proizvoda u stalnom je porastu, a aktualni trendovi tržišta čokoladnih proizvoda fokusirani su na organske, veganske i „raw“ čokolade, ali i sve više na čokolade bez dodanog šećera, kao i čokolade obogaćene vitaminima, mineralnim tvarima, prehrambenim vlaknima i polifenolima. Sukladno ovim trendovima suvremenog tržišta, valorizacija tradicionalnih biljnih vrsta određivanjem njihovog bioaktivnog sastava i bioloških učinaka otvara nove mogućnosti komercijalizacije i u segmentu funkcionalnih čokolada.

U skladu s navedenim, ciljevi ovog istraživanja su:

- i) karakterizacija ekstrakata dobričice pripremljenih različitim tehnikama ekstrakcije;
- ii) određivanje bioloških učinaka ekstrakta dobričice na *in vitro* i *in vivo* modelima;
- iii) formulacija i karakterizacija inkapsuliranih sustava ekstrakta dobričice;
- iv) razvoj inovativnih formulacija čokolada obogaćenih inkapsuliranim ekstraktom.

Rezultati istraživanja proširit će limitirane znanstvene spoznaje o kemijskom i bioaktivnom sastavu dobričice, kao i o potencijalnim biološkim učincima ekstrakta dobričice na *in vitro* i *in vivo* modelima unutar određenog koncentracijskog raspona. Razvijeni inkapsulirani sustavi doprinjet će boljem očuvanju biološke aktivnosti ekstrakta dobričice, a rezultati multidisciplinarnog pristupa istraživanju dobričice doprinjet će povećanju valorizacije ove biljne vrste i široj primjeni u razvoju funkcionalnih proizvoda.



2. Opći dio

2.1. Uporaba ljekovitih biljaka kroz povijest i danas

Tijekom povijesti, biljke su imale važnu ulogu u životu ljudi i životinja osiguravajući im skloništa, kisik i hranu, a tijekom vremena ljudi su naučili prepoznavati i kategorizirati pojedine biljne vrste, ovisno o životnim potrebama, te su i pripravke za različite tegobe i bolesti tražili u prirodi (Mamedov, 2012). S obzirom da nije bilo dovoljno podataka o prirodi nastajanja bolesti i biološkom djelovanju biljaka, gotovo do 19. stoljeća primjena biljaka temeljila se na iskustvu što je s vremenom dovelo do spoznaja o pojedinim terapijskim učincima biljaka pa je uporaba ljekovitih biljaka počela napuštati empirijski okvir i sve više se temeljiti na utvrđenim činjenicama (Petrovska, 2011). Sve civilizacije su razvile tradicionalni oblik medicine na temelju dostupnih biljaka u vlastitom staništu, a prema nekim autorima, to preneseno znanje predstavlja ishodište medicine i farmacije (Salmerón-Manzano i sur., 2020). Najstariji pisani dokazi o uporabi ljekovitih biljaka pronađeni su na sumerskoj glinenoj ploči iz Nagpura, procijenjene starosti od oko 5000 godina, koja je sadržavala 12 recepata za pripremu biljnih pripravaka i preko 250 biljaka, među njima i mak, koji sadrži različite alkaloidne, kao što su morfin, kodein, narkotin, papaverin i tebain, te buniku i mandragoru, također poznate po prisustvu alkaloida, točnije skopolamina i atropina (Passos i Mironidou-Tzouveleki, 2016; Stranska i sur., 2013; Petrovska, 2011). Različite ljekovite biljke, kao što su ginseng, kora cimeta, kositernica, bijeli kužnjak i žuti srčanik, koje se koriste i danas, navedene su i u kineskoj knjizi „Pen T’Sao” koju je napisao car Shen Nung 2500. god. pr. Kr. Uporaba ljekovitih biljaka se u prošlosti često spominjala u religijskoj literaturi pa je tako opisana i u indijskim knjigama Vedama, u kršćanskoj Bibliji i svetoj knjizi Židova Talmudu. Djela antičkog grčkog liječnika Hipokrata (459. – 370. g. pr. Kr.) sadrže 300 ljekovitih biljaka razvrstanih prema fiziološkim učincima te se tako, primjerice, češnjak koristio protiv crijevnih parazita, celer, peršin i šparoge kao diuretici te pelin i kičica u liječenju groznice. Teofrast (371. – 287. g. pr. Kr.), starogrčki filozof koji se smatra ocem botanike, u svojim knjigama „De Causis Plantarum“ i „De Historia Plantarum“ napravio je klasifikaciju više od 500 ljekovitih biljaka koje su tada bile poznate. U opisu farmakološkog djelovanja biljaka Teofrast je istaknuo da se čovjek na njih privikne postupnim povećanjem doza. Veliki doprinos spoznaji ljekovitih biljaka dao je i grčki liječnik Dioskorid koji se smatra ocem farmakognozije. Godine 77. napisao je izrazito vrijedno djelo „De Materia Medica” u kojem su opisane 944 pripravka, od čega je 657 biljnog podrijetla, s opisima vanjskog izgleda biljnih vrsta, lokaliteta, načina sakupljanja te izrade pripravaka i



njihovih terapijskih učinaka. Neke od najučinkovitijih biljaka po fiziološkim aktivnostima prema Dioskoridu bile su kamilica, češnjak, koprija, kadulja, korijander, peršin, itd. U 7. stoljeću slavenski narodi nastavili su s uporabom ljekovitih biljaka u suzbijanju štetnih insekata, ali i koristeći ih kao otrov u lovu. U nastavku srednjeg vijeka terapije i liječenja pojedinih bolesti, ali i uzgoj biljaka te priprema ljekovitih pripravaka, velikim dijelom odvijali su se u krugu samostana. Putovanja istraživača Marka Pola (1254. – 1324.) u tropsku Aziju, Kinu i Perziju, otkriće Amerike (1492.) i putovanja Vasca da Game u Indiju (1498.) rezultirala su uvozom mnogih ljekovitih biljaka u Europu. Širom Europe počeli su se otvarati botanički vrtovi, širio se uzgoj domaćeg ljekovitog bilja, ali i onog uvezenog iz različitih zemalja svijeta, a otkrićem Amerike počinje se koristiti veliki broj novih ljekovitih biljaka, kao što su kininovac, lobelija, ratanjin korijen, kakaovac, vanilija, krestušac, noćurak, crvena paprika, itd. Dok su stari narodi koristili ljekovite biljke prvenstveno pripremljene u obliku infuzija, dekokata ili macerata, u razdoblju između 16. i 18. stoljeća, porasla je potražnja za složenijim pripravcima koji su sadržavali i neke sastojke životinjskog podrijetla. U 18. stoljeću švedski botaničar i liječnik Carl Linné (1707. – 1788.) u svom djelu „Species Plantarum“ (1753.) dao je kratki opis i klasifikaciju do tada opisanih biljnih vrsta te je promijenio sustav nomenklature u binominalni tako da su se u imenu svake biljke navodili rod i vrsta (Petrovska, 2011). Premda su do 18. stoljeća bila poznata ljekovita svojstva mnogih biljaka, kao i njihov učinak na ljudski organizam i način primjene, aktivni spojevi tih biljaka bili su još nepoznati. Razvoj moderne znanosti, posebice kemijskih i instrumentalnih analiza, omogućio je identifikaciju i izolaciju različitih biološki aktivnih spojeva biljaka (Salmerón-Manzano i sur., 2020). Otkriće i izolacija alkaloida iz maka (1806.), ipekakuane (1817.), strihninovca (1817.), kinina (1820.), nara (1878.) i drugih biljaka, a potom i izolacija glikozida, označili su početak razvoja farmacije. Unaprjeđenjem kemijskih metoda otkriveni su i drugi biološki aktivni spojevi iz ljekovitih biljaka poput tanina, saponozida, eteričnih ulja, vitamina, itd. Krajem 19. i početkom 20. stoljeća utvrdilo se da način sušenja biljnog materijala ima značajan utjecaj na njihovo terapijsko djelovanje te su predložene različite metode stabilizacije svježih ljekovitih biljaka, posebice onih čiji sastojci su skloni degradaciji. U 19. stoljeću alkaloidi, glikozidi i drugi spojevi izolirani u čistom obliku, sve više su počeli istiskivali primjenu biljnih materijala iz kojih su izolirani, no, ubrzo se utvrdilo da, iako je djelovanje izoliranih alkaloida brže, djelovanje biljnih pripravaka je učinkovitije i dugotrajnije (Petrovska, 2011).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization* - WHO), danas 80 % svjetske populacije koristi biljke u liječenju bolesti, a udio je veći u zemljama u

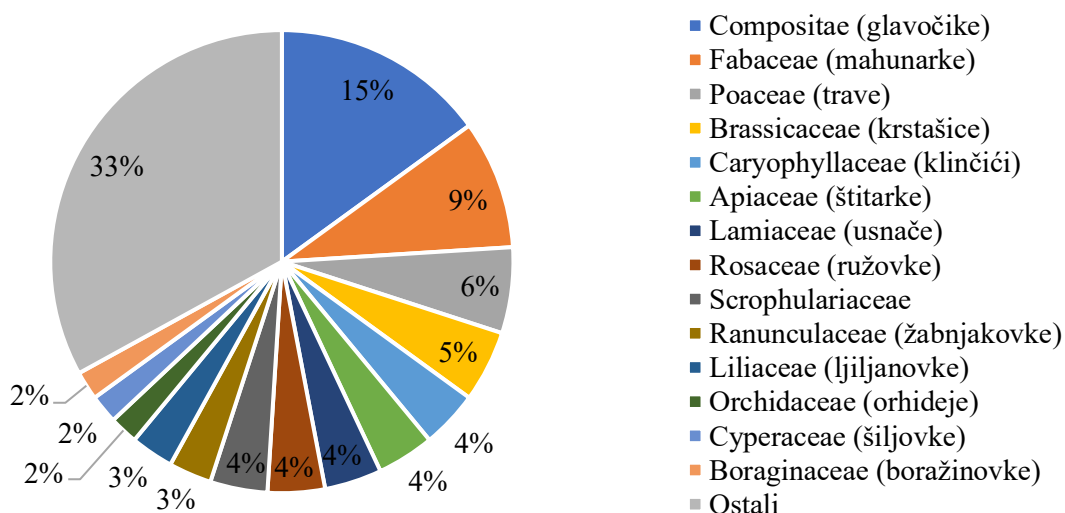


razvoju (WHO, 2005). Primjena biljaka u terapijske svrhe česta je praksa upravo iz razloga jer su biljne sirovine u tim zemljama dostupnije od sintetskih lijekova. S druge strane, jedna trećina stanovništva u SAD-u i europskim zemljama također koristi biljne pripravke u zdravstvene svrhe. Poznato je oko 70 000 biljnih vrsta na svijetu koje se koriste za liječenje bolesti (Ahmed, 2023), a čak 25 % konvencionalnih lijekova u modernoj medicini je biljnog podrijetla što ostavlja puno prostora za daljnja istraživanja ljekovitih biljaka u medicinske svrhe (Yuan i sur., 2016). Iako su se ljekovite biljke i proizvodi od njih koristili tisućama godina, a znanstvene spoznaje skupljale su se stotinama godinama, tek je u 20. stoljeću započeto s regulativom lijekova, a naročito biljnih, koja je zahtijevala podatke o njihovoj kvaliteti, učinkovitosti i sigurnosti (Knöss i Chinou, 2012). Tako su se sedamdesetih godina prošlog stoljeća provodila intenzivna znanstvena istraživanja u svrhu određivanja kemijskog sastava biljaka i razvoja metoda za procjenu bioloških aktivnosti, a u narednim godinama ove su studije bile od velike važnosti za utvrđivanje propisa vezanih uz biljne lijekove u SAD-u i Europi (Süntar, 2020). Unutar Europske unije, Povjerenstvo za biljne lijekove (engl. *Committee on Herbal Medicinal Products*), prema Direktivi 2004/27/EZ, izdaje znanstvena mišljenja o biljnim proizvodima zajedno s informacijama o preporučenoj uporabi u ime Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*) što tvrtkama i nacionalnim nadležnim tijelima predstavlja referentnu točku pri pripremi ili procjeni zahtjeva za odobrenje stavljanja u promet ili registraciju biljnih medicinskih proizvoda (Knöss i Chinou, 2012). Povjerenstvo je sastavljeno od stručnjaka iz područja biljnih lijekova koji pripremaju prijedlog „Popisa Zajednice biljnih tvari, pripravaka i njihove kombinacije“ te „biljnih monografija Zajednice“. Glavni zadaci Povjerenstva su uspostavljanje EU monografija koje predstavljaju sažetak znanstvenog mišljenja Povjerenstva o biljnom lijeku koje se temelji na ocjeni raspoloživih znanstvenih podataka ili na povijesnoj primjeni proizvoda u Europskoj uniji te izrada EU popisa biljnih tvari, pripravaka i njihovih kombinacija koje se primjenjuju kao tradicionalni biljni lijekovi, s podacima o indikacijama, dozi, putu primjene i drugim podacima potrebnima za sigurnu primjenu tradicionalnog biljnog lijeka (Pravilnik, NN 89/2010). Regulativa lijekova u Republici Hrvatskoj redovito je pratila regulativu Europske unije, a 2013. godine potpuno je usklađena s EU Direktivama u području lijekova, uključujući biljne i tradicionalne biljne lijekove, donošenjem Zakona o lijekovima (Zakon, NN 76/2013) i Pravilnika o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (Pravilnik, NN 83/2013) (Trumbetić i Kosalec, 2019).



2.2. Uporaba biljaka na području Republike Hrvatske

Područje Republike Hrvatske ima dugu povijest botaničkih istraživanja te prvi radovi datiraju s kraja 17. stoljeća, a najobuhvatnija djela objavljena su tijekom 19. i početkom 20. stoljeća. Hrvatska flora treća je najbogatija u Europi, poslije slovenske i albanske, uzimajući u obzir broj vrsta i pripadne površine (Nikolić i Topić, 2005), a sastoji se od 4275 vrsta i 1072 podvrsta (5347 svojti) koje su uključene unutar 1086 rodova i 184 porodica (Nikolić, 2001). Izrazito bogatstvo flore rezultat je izvrsnog geografskog položaja jer je Republika Hrvatska smještena na granici kontinentalne i sredozemne klimatske zone čija su područja bila manje ugrožena tijekom ledenog doba te su mnoge vrste preživjele do danas kao reliktna. Iako je površinom mala zemlja, prostire se kroz četiri velike biogeografske regije - alpsku, kontinentalnu, mediteransku i panonsku. Također, kombinacija vrlo raznolikog reljefa, uključujući visoke planinske masive, krška polja, doline rijeka i vrlo razvedenu obalu s brojnim otocima, utjecala je na nastajanje velikog broja biljnih svojti, među kojima je gotovo 10 % endemičnih (Anonymous 1). Prema broju vrsta i podvrsta, najveća je porodica mahunarki (Fabaceae) s 458 svojti, a slijede je porodice glavočika cijevnjača (Asteraceae) s 448 svojti i trava (Poaceae) s 341 svojtom. Ako bi se porodice Asteraceae i Cichoriaceae (glavočike jezičnjače) taksonomski tretirale kao jedinstvena porodica Compositae (glavočike), što je često u literaturi, tada bi ona bila najveća porodica hrvatske flore s ukupno 742 vrste i podvrste. Petnaest najvećih porodica, prikazanih na Slici 1, sadrži 77 % svih vrsta i podvrsta vaskularne flore Hrvatske (Nikolić, 2001).

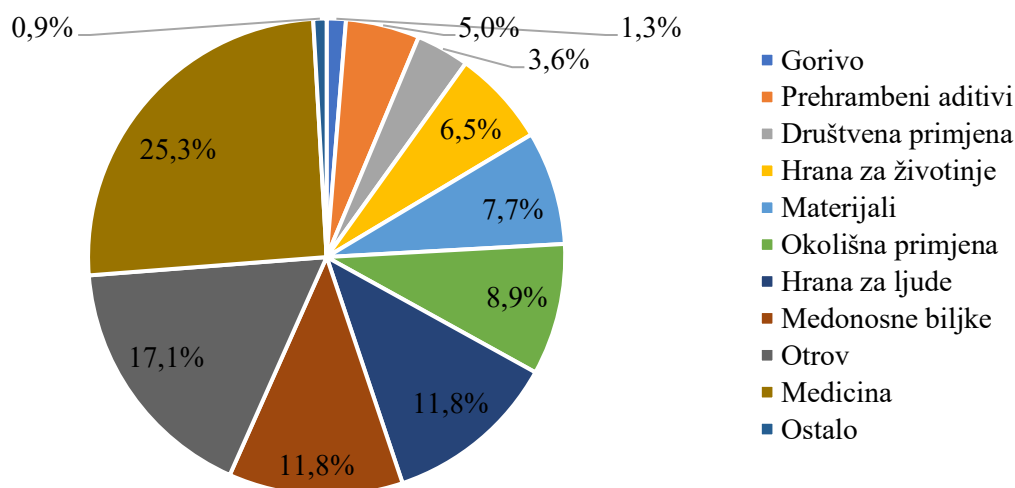


Slika 1. Zastupljenost 15 najvećih porodica u ukupnom broju svojti vaskularne flore Republike Hrvatske (Nikolić, 2001)



Prema arheobotaničkim dokazima, pojedine biljne vrste na području Republike Hrvatske koriste se još od kamenog doba, kao što su *Triticum aestivum* (pšenica) i *Hordeum vulgare* (ječam). Kasnije, u metalnom dobu počele su se koristiti i mnoge druge, poput *Vicia faba* (bob) i *Vitis vinifera* (vinova loza) u brončanom dobu, zatim *Panicum miliaceum* (proso) i *Secale cereale* (raž) u željeznom dobu, a kasnije u antičkom dobu *Camelina sativa* (sjetveni podlanak) i *Olea europaea* (maslina) (Nikolić i Rešetnik, 2007).

Procijenjeno je da danas na hrvatskom području oko 20 % biljnih svojti ima određenu primjenu. Najveći broj vrsta specifične primjene nalazi se unutar porodica Poaceae (109), Fabaceae (77), Asteraceae (76), Rosaceae (67), Lamiaceae (66), Ranunculaceae (51), Brassicaceae (46), Apiaceae (43), Liliaceae (38), Scrophulariaceae (27) i Solanaceae (22) (Nikolić i Rešetnik, 2007). Kao što je prikazano na Slici 2, najviše vrsta koristi se u medicinske svrhe (25,3 %), kao otrovi (17,1 %), hrana za ljude (11,8 %) ili su medonosne biljke (11,8 %) (Nikolić i Rešetnik, 2007).



Slika 2. Primjena biljaka na području Republike Hrvatske (Nikolić i Rešetnik, 2007)

U narodnoj medicini i farmaciji primjenjuje se 735 svojti, od kojih većina njih ima višestruku primjenu. Unutar grupe biljaka koje se koriste u medicinske svrhe, najviše svojti primjenjuje se za liječenje probavnih (65,4 %) i genitourinarnih (53,9 %) tegoba, za liječenje infekcija i infestacija (45 %), tegoba kože i potkožnog staničnog tkiva (41 %), bolesti dišnog sustava (36,9 %), ozljeda (33,3 %), poremećaja metaboličkog sustava (32,8 %), itd. (Nikolić i Rešetnik, 2007). Među porodicama koje su najbogatije ljekovitim biljkama na području Hrvatske ističu se Rosaceae (54), Asteraceae (52), Lamiaceae (49), Apiaceae (36), Ranunculaceae (34), Fabaceae (33) i Brassicaceae (31) (Nikolić i Rešetnik, 2007). Prema podacima Državnog



zavoda za statistiku za 2021. godinu, 6897 hektara žetvenog područja Republike Hrvatske činilo je aromatsko, začinsko i ljekovito bilje, s ukupnom proizvodnjom od 6287 tona i prihodom od 0,9 tona po hektaru. Od aromatskog, začinskog i ljekovitog bilja najviše se uzgajaju kamilica i lavanda (Maleš i Bojić, 2017). Prema podacima Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju za 2020. godinu, proizvodnjom kamilice bavilo se 492 poljoprivrednih gospodarstava, a proizvodnjom lavande 366, dok se u malim količinama proizvodila menta, kadulja, smilje, matičnjak, maslačak, anis, crni i bijeli sljez, stolisnik, bosiljak, origano, lovor, pelin, neven i gavez (Anonymous 2). Uzgoj ljekovitih biljaka u Republici Hrvatskoj ima dugu tradiciju, a kako sve veći broj potrošača traži prirodne biljne proizvode, bilo u kozmetičke ili ljekovite svrhe, ovaj segment tržišta u stalnom je porastu i brzo se razvija (Šakić Bobić, 2021).

2.3. Dobričica (*Glechoma hederacea* L.)

Premda je velika pažnja posvećena uvjetima uzgoja i istraživanju kemijskog sastava različitih ljekovitih, aromatskih i začinskih biljaka široke uporabe na hrvatskom području, postoji još uvijek veliki broj biljaka čiji potencijal, iako se od davnina tradicionalno koriste u narodnoj medicini, nije dovoljno istražen i iskorišten. Primjer takve biljke je i dobričica koja raste na gotovo cijelom području Hrvatske, osim primorskog područja na kojem prevladava mediteranska flora (Grlić, 2005).

Dobričicu (Slika 3), pod latinskim imenom *Glechoma hederacea* prvi puta je spomenuo Carl Linne 1753. godine u knjizi „Species Plantarum“ (Mitich, 1994). Dobričica je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice usnača (Lamiaceae) rasprostranjena na području Europe, Azije i SAD-a (Chou i sur., 2018).



Slika 3. Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) (vlastita fotografija)

Raste uglavnom na zasjenjenim ili blago sunčanim staništima. Ukoliko raste na zasjenjenom staništu, listovi će biti zelene boje, dok će rastom na sunčanom staništu listovi i stabljika pocrvenjeti (Mitich, 1994). Nastanjuje livade, živice i polja umjerenog klimatskog pojasa, a najbolje raste na vlažnim, plodnim i karbonatnim tlima s pH od blago kiselog do blago lužnatog (5,5 – 7,5), iako se može pronaći i na kiselijem tlu (pH < 4) (Azimova i Glushenkova, 2012). Cvjetovi su usnati, ljubičaste ili plave boje, duljine oko 1 centimetar. Najčešće cvate od travnja do kolovoza, a rjeđe u jesen (Grlić, 1990). Istražujući varijacije u svojstvima autohtonih populacija dobričice na različitim staništima u Republici Sloveniji, Sipek i suradnici (2021) zaključili su da su biljke najbolje uspjevale u sjenovitim staništima bogatim hranjivim tvarima gdje su imale najveći pokrov, dok su biljke s otvorenih i sunčanih staništa, prema podacima o kvantnoj učinkovitosti fotosustava II i višoj spolnoj reproduktivnosti, doživjele stres. Autori su također zabilježili najduže stolone i korijenje kod biljaka iz šumskog područja, a najšire i najduže listove kod biljaka koje su rasle uz šumske rubove. Biljke koje su rasle na livadama imale su veći udjel suhe tvari u odnosu na biljke iz zasjenjenijih staništa i znatno bolje karakteristike spolnog razmnožavanja, s gotovo četiri puta više cvjetova i osam puta više sjemena od biljaka iz sjenovitih staništa (Sipek i sur., 2021).

2.3.1. Bioaktivni spojevi dobričice

Najstariji dostupni znanstveni radovi o kemijskom sastavu dobričice vezani su uz identifikaciju masnih kiselina i proteina. Henry i suradnici (1987) izolirali su 9-hidroksi-10,12-oktadekansku kiselinu iz metanolnog ekstrakta dobričice, a Kühn i suradnici (1989) su, uz nju, identificirali i 9-hidroksi-10,12,15-oktadekatriensku kiselinu, 9-okso-10,12,15-oktadekatriensku kiselinu i 9-okso-10,12-oktadekansku kiselinu. Jo i suradnici (2001) istraživali su kemijski sastav dobričice i odredili visoki udjel proteina (oko 20 %), a analizirali su i aminokiselinski sastav te je kao najzastupljenija aminokiselina određena glutaminska kiselina (24,66 mg g⁻¹), potom leucin (7,04 mg g⁻¹), glicin (6,96 mg g⁻¹), lizin (6,46 mg g⁻¹), alanin (5,70 mg g⁻¹) i prolin (5,57 mg g⁻¹), a omjer esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina iznosio je 1:1,85.

Do danas je poznato stotinjak biološki aktivnih spojeva u dobričici, uključujući esencijalne aminokiseline, vitamine, alkaloide, polifenolne spojeve i terpene.

U istraživanju Barros i suradnika (2010), u dobričici su od vitamina identificirani askorbinska kiselina (0,17 mg g⁻¹ s. tv.), α -tokoferol (0,27 mg g⁻¹ s. tv.), β -tokoferol (0,14 mg g⁻¹ s. tv.), γ -tokoferol (0,79 mg g⁻¹ s. tv.) i δ -tokoferol (0,04 mg g⁻¹ s. tv.).



Iz skupine alkaloida, iz dobričice su izolirana samo dva spoja – hederacin A i hederacin B, koji su pokazali toksično djelovanje u eksperimentu ispitivanja smrtnosti škampa s LC_{50} vrijednostima $3,2 \times 10^{-3}$ i $1,4 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹, dok metanolni ekstrakt dobričice nije pokazao takav učinak zbog vrlo niskog udjela spomenutih alkaloida (0,0047 – 0,0056 %) (Kumarasamy i sur., 2003).

Polifenolni spojevi su najznačajniji i najviše istraživani bioaktivni spojevi dobričice čiji udjel je u rasponu od oko 30 do 100 mg g⁻¹ s. tv. (Sile i sur., 2022; Belščak-Cvitanović i sur., 2014). Do sada, u dobričici je identificirano 40-tak flavonoida i fenolnih kiselina koji su prikazani u Tablici 1.

Kikuchi i suradnici (2008) i Yamauchi i suradnici (2007) provodili su izolaciju različitih glikozida iz dobričice s područja Japana. Provedena je ekstrakcija s metanolom nakon čega je provedeno frakcioniranje te identifikacija frakcija masenom spektrometrijom i nuklearnom magnetskom rezonancijom. Kikuchi i suradnici (2008) od flavonoidnih glikozida identificirali su apigenin 7-*O*-neohesperidozid i krizoeriol 7-*O*-neohesperidozid, a od ostalih neflavonoidnih glikozida (6*R*, 7*E*, 9*R*)-megastigma-4,7-dien-3-on 9-*O*-β-D-glukopiranozid, (+)-pinoresinol 4,4'-bis-*O*-β-D-glukopiranozid, (+)-siringaresinol 4,4'-bis-*O*-β-D-glukopiranozid, lariciresinol 4,4'-bis-*O*-β-D-glukopiranozid, (7*R*, 8*R*)-7,9,9'-trihidroksi-3,3'-dimetoksi-8-*O*-4'-neolignan 4-*O*-β-D-glukopiranozid. Yamauchi i suradnici (2007) identificirali su apigenin 7-*O*-β-D-glukopiranozid, luteolin 7-*O*-β-D-glukopiranozid, 7*S*, 7'*S*, 8*R*, 8'*R*-ikariol A₂-9-*O*-β-D-glukopiranozid, 4-alil-2-hidroksifenil 1-*O*-β-D-apiosil-(1→6)-β-D-glukopiranozid, cistanozid E i dihidrodehidrodikoniferil alkohol-4-*O*-β-D-glukopiranozid.

Istraživan je također i sastav eteričnog ulja dobričice, dobiven hidroddestilacijom, u kojem većinom prevladavaju seskviterpeni i monoterpeni (Tablica 2), a koji posjeduje potencijal u razvoju aromaterapije koja se koristi u komplementarnoj i alternativnoj medicini (Chou i sur., 2018).



Tablica 1. Polifenolni profil dobričice

Područje rasta	Uvjeti ekstrakcije	Pojedinačne fenolne kiseline i njihovi derivati	Pojedinačni flavonoidi i njihovi glikozidi	Referenca
Łęka, Poljska	omjer uzorak/otapalo 1:20 (70 %-tni metanol), 5 sati uz ekstrakciju u ultrazvučnoj kupelji 15 minuta svaki sat	ružmarinska kiselina (63,72 mg g ⁻¹ ekstrakta), klorogenska kiselina (27,44 mg g ⁻¹ ekstrakta), neoklorogenska kiselina (16,6 mg g ⁻¹ ekstrakta), 2- <i>O</i> -kafeoiltreonska kiselina (13,55 mg g ⁻¹ ekstrakta), fertarna kiselina (3,32 mg g ⁻¹ ekstrakta), 3- <i>O</i> -kafeoiltreonska kiselina (2,69 mg g ⁻¹ ekstrakta), kriptoklorogenska kiselina (2,61 mg g ⁻¹ ekstrakta), 4- <i>O</i> -kafeoiltreonska kiselina (1,87 mg g ⁻¹ ekstrakta), <i>p</i> -kumarilkininska kiselina (1,10 mg g ⁻¹ ekstrakta), 1- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina (1,12 mg g ⁻¹ ekstrakta), gentizinska kiselina 5- <i>O</i> -glukozid (0,82 mg g ⁻¹ ekstrakta)	apigenin 7-(6'' malonilglukozid) (10,51 mg g ⁻¹ ekstrakta), hiperozid (9,03 mg g ⁻¹ ekstrakta), luteolin 7- <i>O</i> -glukozid (8,68 mg g ⁻¹ ekstrakta), apigenin 7- <i>O</i> -glukozid (6,32 mg g ⁻¹ ekstrakta), luteolin 7- <i>O</i> -(6'' malonilglukozid) (5,49 mg g ⁻¹ ekstrakta), kvercetin 3- <i>O</i> -(2'' ramnozil)-7- <i>O</i> -rutinozid (4,52 mg g ⁻¹ ekstrakta), apigenin (3,49 mg g ⁻¹ ekstrakta), kvercetin 3- <i>O</i> -(6'' malonilglukozid)-7-glukozid (2,16 mg g ⁻¹ ekstrakta), luteolin (2,05 mg g ⁻¹ ekstrakta)	Sławińska i sur. (2023)
San Michele all'Adige, Italija	maceracija, 40 g uzorka i 300 mL otapala (50 %-tni metanol), 2 dana, sobna temperatura	ružmarinska kiselina (0,12 mg g ⁻¹ suhog uzorka), kafeinska kiselina (0,08 mg g ⁻¹ suhog uzorka)	cirsimaritin (0,16 mg g ⁻¹ suhog uzorka), apigenin (0,09 mg g ⁻¹ suhog uzorka), karvakrol (0,66 mg g ⁻¹ suhog uzorka)	Zorilla i sur. (2023)
Krakov, Poljska	ekstrakcija uz refluks (1 i 2 sata) i infuzija (1 sat, sobna temperatura), 1 g uzorka i 50 mL otapala (voda i etanol)	ružmarinska kiselina (4,89 mg g ⁻¹ s. tv.), klorogenska kiselina (3,70 mg g ⁻¹ s. tv.), protokatehinska kiselina (0,47 mg g ⁻¹ s. tv.)	rutin (0,99 mg g ⁻¹ s. tv.), izokvercetin (0,96 mg g ⁻¹ s. tv.)	Grabowska i sur. (2022)



Tablica 1. Polifenolni profil dobričice – nastavak

Područje rasta	Uvjeti ekstrakcije	Pojedinačne fenolne kiseline i njihovi derivati	Pojedinačni flavonoidi i njihovi glikozidi	Referenca
Ainaži, Viļaka i Sigulda, Latvija	maceracija, omjer uzorak/otapalo 1:10 (70 %-tni etanol), 7 dana	ružmarinska kiselina (0,66-7,92 mg g ⁻¹ s. tv.), klorogenska kiselina (1,46-6,98 mg g ⁻¹ s. tv.), kafeinska kiselina (0,09-0,32 mg g ⁻¹ s. tv.)	rutin (0,68-4,15 mg g ⁻¹ s. tv.), hiperozid (0,81-2,92 mg g ⁻¹ s. tv.), kemferol 3- <i>O</i> -rutinozid (0,05-0,68 mg g ⁻¹ s. tv.), apigenin (0,004-0,27 mg g ⁻¹ s. tv.), luteolin (0,01-0,13 mg g ⁻¹ s. tv.), apigenin 7- <i>O</i> -glukozid (0,68-3,23 mg g ⁻¹ s. tv.)	Sile i sur. (2022)
Taichung, Tajvan	omjer uzorak/ otapalo 1:50 (voda), 3 sata, 100 °C	ružmarinska kiselina (13,98 mg g ⁻¹ s. tv.), klorogenska kiselina (2,50 mg g ⁻¹ s. tv.), kafeinska kiselina (1,82 mg g ⁻¹ s. tv.), ferulinska kiselina (0,67 mg g ⁻¹ s. tv.)	rutin (0,94 mg g ⁻¹ s. tv.), genistin (0,90 mg g ⁻¹ s. tv.), daidzin (0,14 mg g ⁻¹ s. tv.), genistein (0,02 mg g ⁻¹ s. tv.)	Chou i sur. (2019)
Zagreb, Hrvatska	10 g uzorka i 200 mL otapala (kipuća voda), 30 minuta	ružmarinska kiselina (3,24 mg g ⁻¹ s. tv.), klorogenska kiselina (1,30 mg g ⁻¹ s. tv.), kafeinska kiselina (0,25 mg g ⁻¹ s. tv.)	/	Belščak-Cvitanović i sur. (2014)
Japan	1,98 kg uzorka i 15 L otapala (metanol), 40 sati, sobna temperatura	kafeinska kiselina (3,75 mg g ⁻¹ uzorka), vanilinska kiselina (2,0 mg g ⁻¹ uzorka), 4-hidroksibenzojeva kiselina (1,15 mg g ⁻¹ uzorka), 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (1,0 mg g ⁻¹ uzorka)	luteolin (10,0 mg g ⁻¹ uzorka), prainianonid (1,35 mg g ⁻¹ uzorka), 5-hidroksi-6,7,4'-trimetoksi flavon (1,05 mg g ⁻¹ uzorka)	Masuda i sur. (2013)
Daejeon, Južna Koreja	7,4 g uzorka i 120 mL otapala (etanol), 3 dana, sobna temperatura	metil izoferuloil-7-(3,4-dihidroksifenil) laktat (6,21 mg g ⁻¹ suhog uzorka), metil ružmarinat (6,08 mg g ⁻¹ suhog uzorka), ružmarinska kiselina (3,24 mg g ⁻¹ suhog uzorka), 3'- <i>O</i> -metil-ružmarinska kiselina (1,35 mg g ⁻¹ suhog uzorka), etil ružmarinat (0,81 mg g ⁻¹ suhog uzorka)	/	Kim i sur. (2011)



Tablica 2. Sastav eteričnog ulja dobričice

Područje rasta	Iskorištenje	Najzastupljeniji spojevi (> 2,5 %)	Referenca
Ainaži, Viļaka i Sigulda, Litva	0,03 – 0,3 %	kumen (0,5-14,2 %), 1-okten-3-ol (1,4-10,9 %), β -mircen (0,8-5,7 %), eukaliptol (2,0-28,5 %), <i>cis</i> - β -ocimen (2,8-37,3 %), β -burbonen (0,8-3,8 %), β -elemen (0,2-9,1 %), germakren D (12,6-34,5 %), biciklo-germakren (0,4-4,0 %), δ -guaien (2,5-8,5 %), germakren B (0,3-24,5 %), spatulenol (0,3-2,9 %), metil linolenat (0,3-4,2 %), fitol (0,3-5,7 %)	Sile i sur. (2022)
Taichung, Tajvan	0,08 %	β -pinen (2,96 %), <i>trans</i> -3-pinanon (41,44 %), nopol (2,83 %), β -elemen (3,75 %), β -kariofilen (10,19 %), germakren D (2,62 %), 4,5,6,7-tetrahidro-5-izopropenil-3,6- β -dimetil-6- α -vinilbenzofuran (10,79 %), spatulenol (4,26 %)	Chou i sur. (2018)
Litva	0,04 – 0,05 %	1-okten-3-ol (2,9-4,5 %), sabinen (0,4-12,3 %), <i>p</i> -cimen (0,3-2,6 %), 1,8-cineol (2,7-41,6 %), (<i>Z</i>)- β -ocimen (1,6-6,1 %), β -elemen (1,1-7,3 %), β -kariofilen (4,3-14,2 %), γ -elemen (3,8-9,6 %), α -humulen (0,3-3,8 %), germakren D (4,3-15,5 %), bisabolen (0,6-3,5 %), kariofilen oksid (0,5-5,9 %)	Judzentiene i sur. (2015)
Pirot, Srbija	0,09 %	1,8-cineol (42,6 %), 1-okten-2-il acetat (3,1 %), α -terpineol (2,5 %), spatulenol (7,4 %), kariofilen oksid (2,5 %)	Radulović i sur. (2010)
Vilnius, Litva	0,02 – 0,03 %	β -elemen (8,7-12,9 %), γ -elemen (9,0-16,0 %), germakren D (14,1-20,7 %), mircen (0,4-3,2 %), 1,8-cineol (2,2-5,4 %), (<i>Z</i>)- β -ocimen (2,2-8,5 %), β -ilangen (2,7-4,1 %), biciklo-germakren (1,4-2,5 %), germakren B (2,2-3,9 %), pentadekan (0,4-2,9 %)	Mockute i sur. (2007)



2.3.2. *Biološki učinci dobričice*

Unatoč dugoj povijesti primjene u narodnoj medicini, biološko djelovanje dobričice još uvijek je nedovoljno istraženo. Prema znanstvenoj bazi Web of Science, do travnja 2024. godine, objavljeno je samo 16 znanstvenih radova s temom biološke aktivnosti dobričice (WoS, 2014) koja se odnosi na antioksidacijsko, protuupalno, antimelanogeno, neuroprotektivno, hepatoprotektivno i antimikrobno djelovanje.

Najstariji dostupni znanstveni rad vezan uz biološku aktivnost dobričice (Zhou i sur., 2021) je istraživanje Henry i suradnika (1987) u kojem je izolirana masna kiselina 9-hidroksi-10-*trans*,12-*cis*-oktadekanska kiselina iz metanolnog ekstrakta dobričice koja je pokazala sposobnost povećanja aktivacije enzima adenilat ciklaze u trombocitnim membranama. An i suradnici (2006) objavili su da se vodeni dekoka dobričice može koristiti u kontroli bolesti uzrokovanih upalom posredovanom makrofagima pošto su dokazali na modelu mišjih peritonealnih makrofaga da dekoka djeluje kao inhibitor dušikovog oksida i proizvodnje citokina IL-12p70 i TNF- α .

Chou i suradnici (2012) proučavali su vodeni ekstrakt dobričice i zaključili su da ima snažno antioksidacijsko djelovanje, izraženije čak i od vitamina C i Trolox-a, u neutralizaciji superoksidnih anionskih radikala i sposobnosti keliranja Fe²⁺. Qiao i suradnici (2012) objavili su da ekstrakt dobričice posjeduje antimelanogeno djelovanje pošto smanjuje udjel melanina i aktivnost tirozinaze u stanicama melanoma B16 te da bi se stoga mogao potencijalno koristiti u liječenju hiperpigmentacije i kao učinkoviti sastojak kozmetičkih proizvoda za izbjeljivanje. Hwang i suradnici (2014) dokazali su da etanolni ekstrakt dobričice inhibira osteoklastogenezu ukidanjem oscilacija slobodnog citosolnog Ca²⁺ izazvanih receptorskim aktivatorom nuklearnog κ -B liganda (RANKL). Nadalje, uz već ranije dokazano snažno antioksidacijsko djelovanje, vodeni ekstrakt dobričice pokazao je i izraženo protuupalno djelovanje u istraživanju Chou i suradnika (2019). Ekstrakt dobričice rezultirao je redukcijom razine stanične upale u LPS-om (bakterijski lipopolisaharid) stimuliranim stanicama mišjih makrofaga RAW 264.7 smanjenjem razine ROS-ova (engl. *reactive oxygen species* (ROS) - reaktivne kisikove vrste) i regulacijom ekspresije proupalnih gena što je povezano s prisutnošću polifenolnih spojeva budući da oni inhibiraju ekspresiju NF- κ B u LPS-om stimuliranim makrofagima (Chou i sur., 2019). Neuroprotektivno djelovanje vodenog ekstrakta dobričice na stanice PC12 feokromocitoma štakora, izložene djelovanju H₂O₂, dokazano je u radu Chao i suradnika (2021a) kroz zaštitni učinak na oštećenja DNK, stabilizaciju mitohondrijskog



transmembranskog potencijala, inhibiciju aktivnosti caspaze-3, apoptoze, otpuštanja citokroma C i faktora koji induciraju apoptozu te smanjenjem udjela malondialdehida. Nadalje, Chao i suradnici (2021b) objavili su da etil acetatna frakcija dobričice posjeduje visoki potencijal za liječenje hepatocelularnog karcinoma zbog inhibitornog djelovanja na proliferaciju stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 putem intracelularne apoptoze posredovane ROS-ovima. Grabowska i suradnici (2022) istraživali su citotoksično djelovanje vodenog i etanolnog ekstrakta dobričice na staničnim linijama kože (stanične linije melanoma A375 i HTB140 i stanične linije keratinocita HaCaT) i probavnog sustava (stanične linije adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 i HT-29 i hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2) te zaključili da su sigurni za oralnu i topikalnu uporabu. Nadalje, izrazito antioksidacijsko djelovanje ekstrakta dobričice objavljeno je i u radu Sławińska i suradnika (2023) kroz inhibirajući učinak na H_2O_2/Fe^{2+} -induciranu peroksidaciju lipida i karbonilaciju proteina u ljudskoj plazmi, kao i na smanjenje H_2O_2 -induciranog oksidacijskog oštećenja DNK u PBM stanicama (mononuklearne stanice periferne krvi).

U istraživanju El-Aasr i suradnika (2023) istaživan je *in vivo* potencijal metanolnog ekstrakta dobričice, u obliku hidrogelova, u zacjeljivanju rana štakora zaraženih bakterijom *Staphylococcus aureus*. Rezultati istraživanja (El-Aasr i sur., 2023) ukazali su na značajno smanjenje broja bakterija kod grupa tretiranih s hidrogelovima s 5 % ekstrakta dobričice u usporedbi s grupom tretiranom s antibiotikom Fucidinom. *In vivo* metodologijom na štakorima u radu Wang i suradnika (2017a) dokazano je da primjena vodenog ekstrakta dobričice kod kolestatske bolesti jetre utječe na poboljšanje biokemijskih parametara u serumu (AST, ALT, ukupne žučne kiseline i aktivnost γ -GT), smanjenje intenziteta peroksidacije lipida seruma i jetre te da djeluje protuupalno kroz potiskivanje infiltracije/aktivacije upalnih stanica, signalizaciju HMGB1/TLR4, aktivaciju NF- κ B/AP-1 i proizvodnju upalnih citokina, kao i na smanjenje fibroze jetre i aktivaciju miofibroblasti. Tvrtka Pharma Evers (Njemačka) razvila je proizvod Hitrechol[®] koji sadrži ekstrakt dobričice, a namijenjen je liječenju kolelitijaze, odnosno otapanju žučnih kamenaca. Na službenim stranicama tvrtke Pharma Evers navedeno je da se liječenje žučnih kamenaca ovim proizvodom temelji na različitim farmakološkim djelovanjima dobričice, kao što su litolitičko (otapanje kolesterolskih žučnih kamenaca), kolagogično (regulacija žučnog mjehura koja potiče izlučivanje žuči iz jetrenih stanica i povećava protok žuči), hepatoprotektivno (zaštita oštećenih stanica jetre antioksidacijskim djelovanjem), protuupalno (smanjenje upalnih procesa u stijenci žučnog mjehura), spazmolitičko (opuštanje mišićnih stanica u žučnim kanalima i olakšavanje protoka žuči) i



antimikrobno djelovanje (Anonymous 3). Navedeni učinci dokazani su u radu Xiao i suradnika (2021) na modelu štakora. Iako rezultati istraživanja (Xiao i sur., 2021) nisu ukazali na značajnu promjenu brzine protoka žuči uslijed tretmana ovim proizvodom, uočeno je značajno smanjenje veličine i količine kristala žučnih kamenaca, kao i razine ukupnog kolesterola i ukupne žučne kiseline.

Biološko djelovanje eteričnog ulja dobričice istraživano je jedino u radu Chou i suradnika (2018) koji su objavili da ono posjeduje snažno antioksidacijsko djelovanje, kao i inhibitorno djelovanje na proces melanogeneze u stanicama melanoma B16. Točnije, istraživanje je pokazalo da eterično ulje dobričice značajno smanjuje proizvodnju melanina i aktivnost tirozinaze u B16 stanicama stimuliranim α -MSH (α -melanocitni stimulirajući hormon), kao rezultat snažne antioksidacijske aktivnosti koja se odražava u smanjenim razinama staničnih oksidansa i malondialdehida, kao i u obnovljenim aktivnosti enzima glutacion peroksidaze i superoksid dismutaze.

Kumarasamy i suradnici (2002) istraživali su antibakterijsko djelovanje ekstrakata dobričice, pripremljenih s *n*-heksanom, diklormetanom i metanolom, na Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, i isto je uočeno jedino kod metanolnog ekstrakta, a najizraženiji učinak uočen je na bakteriji *Micrococcus luteus* (Tablica 3). Vodeno-alkoholni ekstrakt dobričice u radu Coss i suradnika (2019) nije pokazao antibakterijsko djelovanje na bakterije *Enterococcus hirae* i *Escherichia coli*, dok je na bakteriju *Staphylococcus aureus* ono bilo izrazito slabo (Tablica 3). Gwiazdowska i suradnici (2022) su, uz antibakterijsko djelovanje, istraživali i antifungalni učinak ekstrakta dobričice i inhibitorni učinak na razvoj biofilмова bakterija. Ekstrakt je pripremljen superkritičnim CO₂ uz konstantan tlak (250 bar) i varijaciju temperatura (40, 50 i 60 °C). Najizraženije antibakterijsko djelovanje pokazao je ekstrakt pripremljen pri 40 °C (Tablica 3), što je povezano s većim udjelom polifenolnih spojeva u usporedbi s ekstraktima pripremljenima pri 50 i 60 °C. Također, antibakterijski učinak bio je izraženiji kod Gram pozitivnih bakterija u usporedbi s Gram negativnim bakterijama, a najizraženije djelovanje uočeno je na bakteriji *Staphylococcus aureus*. Isti ekstrakt (40 °C) najviše je inhibirao stvaranje biofilмова kod bakterija *Escherichia coli* (94,2 %), *Enterococcus faecalis* (96,7 %), *Pseudomonas aeruginosa* (88,6 %) i *Bacillus subtilis* (87,9 %). Antifungalna aktivnost istraživana je na 6 različitih patogenih gljiva i pokazalo se da je antifungalno djelovanje uglavnom ovisilo o vrsti patogene gljive, dok uvjeti ekstrakcije nisu utjecali na aktivnost ekstrakata. Određene vrijednosti za MIC (engl. *minimum inhibitory concentration*) za *Fusarium graminearum* (KZF 1), *Fusarium culmorum* (KZF 5), *Alternaria alternata* (KZF 13),



Sclerotinia sclerotiorum (KZF 23), *Botrytis cinerea* (BPR 187) i *Candida albicans* (ATCC 10231) iznosile su redom 2,5, 5,0, 5,0, 1,25, 5,0 i 1,25 mg mL⁻¹. Kao zaključak istraživanja (Gwiazdowska i sur., 2022) navodi se potencijalna primjena ekstrakta dobričice u različitim fazama proizvodnje hrane, kao sigurna alternativa kemijskim konzervansima ili dezinficijensima. Kováts i suradnici (2011) objavili su da je vodeni ekstrakt dobričice, između više istraživanih vrsta iz porodice Lamiaceae, pokazao najjaču antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *Vibrio fischeri* s EC₅₀ (pola maksimalne učinkovite koncentracije) vrijednošću od 0,407 g L⁻¹.

2.3.3. Uporaba dobričice

Među najstarijim dostupnim podacima o uporabi dobričice, Dioskorid (oko 40. – 90.) je tu biljku opisivao pod nazivom „chamaikissos“ navodeći da u obliku dekokta može pomoći kod liječenja žutice i ublažavanju bolova u kukovima. Gaj Plinije Sekund (23. – 79.) navodi da dobričica pomaže i kod bolesti slezene te da se u obliku kreme može primijeniti na opekline (Tobyn i sur., 2011). Prema grčko-rimskoj mitologiji, dobričica je uspješno liječila i melankoliju (Hatfield, 1971). U knjizi „Red Book“, liječnika iz Myddfai (UK), iz 13. stoljeća, piše da se ekstrakt dobričice kapao u oči za uklanjanje zamućenosti, da se kuhana biljka stavljala na glavu pacijenta u slučaju slabosti ili groznice i da se krema od dobričice koristila u slučaju ugriza bijesnog psa (Tobyn i sur., 2011). Njemačka časna sestra Hildegarda iz Bingena (1098. – 1179.) u svojoj knjizi „Physica“ također navodi određene dobrobiti dobričice, između ostalog i ublažavanje bolova u prsima i poticanje boljeg raspoloženja (Hozeski, 2001). Europski travari koristili su dobričicu za liječenje tegoba mokraćnog mjehura, bubrega, probavnog sustava i kože te u slučaju gihta, kašlja, prehlade i zujanja u ušima, a i za liječenje bolesti očiju kod stoke (Gerard, 1964). Engleski doseljenici donijeli su dobričicu u Novi svijet kao dio svoje standardne zalihe kućnog bilja (Hatfield, 1971), a prvi pisani podaci o dobričici u Sjevernoj Americi datiraju iz 1672. godine iz Nove Engleske (Pavek, 2013). Uporaba dobričice proširila se potom i na području SAD-a gdje se tijekom 19. stoljeća koristila za liječenje plućnih i bubrežnih bolesti, astme, žutice, hipohondrije, monomanije i glavobolje. Dobričica se i danas koristi u iste svrhe kao tradicionalni biljni pripravak, najčešće u obliku infuzija i dekokta, s time da je danas poznato da su biološki učinci dobričice rezultat prisustva različitih bioaktivnih spojeva (Pereira i sur., 2020). Stari engleski recepti preporučuju čak dodatak dobričice džemovima, juhama i jelima od povrća (Mitich, 1994), a u Njemačkoj se usitnjeni mladi listovi dodaju juhama, salatama, namazima, varivima i jajima, kao začim (Grlić, 2005).



Tablica 3. Antimikrobno djelovanje ekstrakta dobričice

Gram pozitivne bakterije	MIC (engl. <i>minimum inhibitory concentration</i>) (mg mL ⁻¹)		Logaritamska redukcija	Gram negativne bakterije	MIC (engl. <i>minimum inhibitory concentration</i>) (mg mL ⁻¹)		Logaritamska redukcija
	Referenca				Referenca		
	Kumarasamy i sur. (2002)	Gwiazdowska i sur. (2022)	Coss i sur. (2018)		Kumarasamy i sur. (2002)	Gwiazdowska i sur. (2022)	Coss i sur. (2018)
<i>Bacillus cereus</i> NCTC 9680	1,00	-	-	<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	0,125	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 7861	0,5	-	-	<i>Escherichia coli</i> NCTC 8110	0,25	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774	-	0,6	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	2,5	-
<i>Enterococcus faecalis</i> NCIB 775	0,125	-	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	-	-	0
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	-	-	0	<i>Escherichia coli</i> NCTC 11954	5,00	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	-	0,6	/	<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 9528	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCTC 6376	0,5	-	-	<i>Proteus mirabilis</i> NCIB 60	0,5	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 9278	0,0625	-	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 6750	0,125	-	-



Tablica 3. Antimikrobno djelovanje ekstrakta dobričice – nastavak

Gram pozitivne bakterije	MIC (engl. <i>minimum inhibitory concentration</i>) (mg mL ⁻¹)		Logaritamska redukcija	Gram negativne bakterije	MIC (engl. <i>minimum inhibitory concentration</i>) (mg mL ⁻¹)		Logaritamska redukcija
	Referenca				Referenca		
	Kumarasamy i sur. (2002)	Gwiazdowska i sur. (2022)	Coss i sur. (2018)		Kumarasamy i sur. (2002)	Gwiazdowska i sur. (2022)	Coss i sur. (2018)
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	-	1,25	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	1,25	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ACTC 10788	0,25	-	-	<i>Serratia marcescens</i> NCTC 1377	0,5	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCIB 8558	0,5	-	-	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-	1,25	-
<i>Staphylococcus hominis</i> NCTC 11320	0,5	-	-				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	-	0,3	-				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6358	-	-	> 0,01				



Savković (2017) navodi da se pripravak od dobričice protiv gihta i reume priprema od listova kuhanih u jabučnom octu, a da se pripravak za ublažavanje tegoba limfnog sustava konzumira u obliku toplog vodenog napitka 2 puta dnevno kroz 21 dan, nakon čega je potrebno napraviti pauzu od 7 dana i ponoviti ciklus, dok je kod upale želuca i crijeva preporuka piti 1,5 dL pripravka svaka 2 sata. Također, Savković (2017) navodi da se dobričica može konzumirati i kuhana kao povrće, pripremljena kao špinat.

Izuzev uporabe u medicinske svrhe, dobričica pokazuje potencijal i u drugim područjima. Zanimljivo je istaknuti da je dobričica, prije uzgoja hmelja, korištena za poboljšanje okusa i bistrenje u procesu proizvodnje piva. Nijemci su počeli uzgajati hmelj u 8. stoljeću, dok je u Engleskoj dobričica u tu svrhu bila u uporabi sve do 14. stoljeća (Pavek, 2013; Hutchings i Price, 1999; Mitich, 1994).

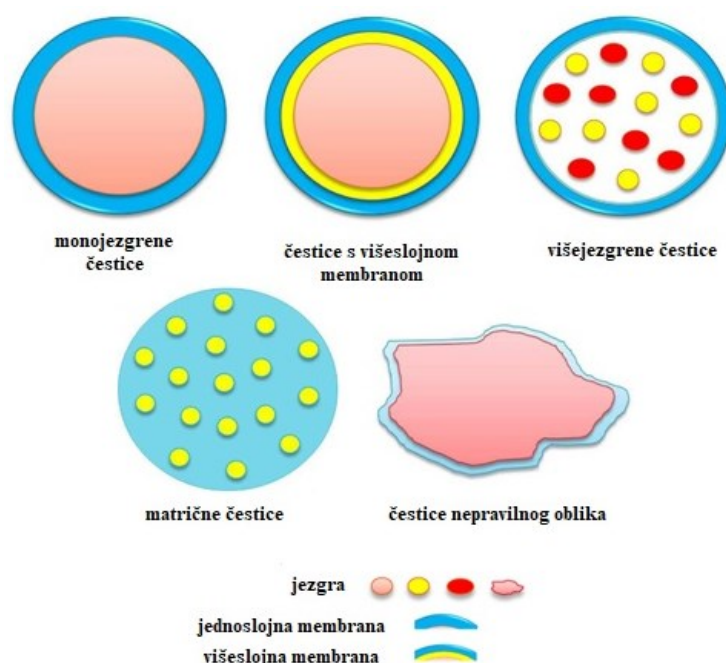
Zorilla i suradnici (2023) prvi su objavili snažnu aktivnost vodenog ekstrakta dobričice, sakupljene na području Italije, protiv patogenih oomiceta, točnije protiv endoparazita *Plasmopara viticola* koji napada vinovu lozu, čime pokazuje potencijal u razvoju biofungicida. Prskanjem ekstrakta dobričice na lisne diskove vinove loze utvrđeno je značajno smanjenje zaraženosti peronosporom (11,4 %), u usporedbi s lisnim diskovima vinove loze prskanima destiliranom vodom (78,0 %), ali ipak nešto niža u odnosu na primjenu fungicida na bazi bakra (2,3 %). Nadalje, Wang i suradnici (2003) objavili su da listovi dobričice, sakupljeni na području Belgije, sadrže lektin naziva Gleheda, koji je strukturno i evolucijski srodan lektinima mahunarki, te da je snažni insekticidni protein. Unatoč tome što Gleheda nije ravnomjerno raspoređen po listovima dobričice, pokazuje jedinstveni uzorak lokalizacije karakteriziran isključivim ograničenjem na jedan sloj stanica palisadnog parenhima. Ispitivanja hranjenja insekata Glehedom pokazala su da je snažan insekticidni protein za ličinke krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata*). Autori (Wang i sur., 2003) navode da Gleheda nije citotoksičan i povezuju njegovo insekticidno djelovanje sa specifičnošću prema antigenu Tn (N-acetilgalaktozamin vezan sa serinom ili treoninom) što u konačnici dovodi do narušavanja funkcioniranja probavnog sustava kukaca.

2.4. Inkapsulacija bioaktivnih spojeva

Inkapsulacija je proces u kojem se materijal ugrađuje unutar ili prevlači sustavom nosača kako bi se formirale čestice različitih veličina (Islam Shishir i sur., 2018). Materijal koji se inkapsulira - aktivna tvar, može biti jedan spoj ili skupina spojeva te se naziva još jezgra, ispun



ili unutarnja faza. Nosači se nazivaju još i membrane, matrice ili vanjske faze, a najčešće su to različiti biopolimeri animalnog, biljnog, morskog ili mikrobnog podrijetla, poput ugljikohidrata (npr. alginat, pektin, guar guma, kitozan, arapska guma, karagenan, ksantan, itd.), proteina (npr. želatina, kazein, proteini sirutke, gluten, itd.) i lipida (npr. gliceridi, voskovi, fosfolipidi, itd.) (Timilsena i sur., 2020; Saifullah i sur., 2019; Devi i sur., 2017). Odabir nosača u inkapsulaciji ovisi o svojstvima aktivne tvari, tehnici inkapsulacije koja se primjenjuje te o namjeni konačnog proizvoda inkapsulacije (Saifullah i sur., 2019). Nosač definira konačna svojstva proizvoda dobivenog inkapsulacijom – utječe na veličinu, oblik i strukturu čestica te na njihovu stabilnost tijekom proizvodnje i skladištenja (Dias i sur., 2017). Najpoželjniji proizvodi inkapsulacije su nanočestice i mikročestice koje se odnose na čestice raspona veličine 1 – 1000 nm, odnosno 1 – 1000 μm , dok se veće čestice nazivaju makročesticama. Morfologija čestica dobivenih inkapsulacijom može biti različita te se razlikuju monojezgrene, višejezgrene i matrice čestice (Slika 4). Monojezgrene čestice sadrže membranu oko jedne jezgre, dok višejezgrene sadrže više jezgara unutar membrane, a kod matrice čestica, jezgra se nalazi jednoliko raspršena unutar membrane. Također, čestice mogu biti monojezgrene s višeslojnom membranom, a mogu biti i nepravilnog oblika (Saifullah i sur., 2019).



Slika 4. Morfologija čestica dobivenih inkapsulacijom (prema Saifullah i sur., 2019)

Počeci istraživanja inkapsulacije vezani su uz medicinsku primjenu, a inkapsulacija se prvi puta spominje u radu Vincenza Bisceglie objavljenom 1934. godine (Wang i sur., 2017b). U tom radu Bisceglie (1934) je naveo da polimerna struktura koja se koristi za omotavanje tumorskih stanica ima sposobnost sprječavanja imunološkog odgovora u tijelu domaćina na strane stanice što je omogućilo da transplantat tumorskih stanica preživljava u tijelu domaćina duže vremensko razdoblje. Thomas Chang je 1964. godine predložio koncept „umjetnih stanica“ prilikom korištenja polupropusnih mikrokapsula za isporuku terapijskih spojeva (Chang, 1964). U narednim godinama porastao je broj istraživanja vezanih uz primjenu inkapsulacije u medicinske svrhe te je 1980. godine provedeno prvo predkliničko ispitivanje na štakorima s dijabetesom kojima je pomoću inkapsuliranih Langerhansovih otočića vraćeno stanje normoglikemije (Lim i Sun, 1980). U međuvremenu, uz medicinska istraživanja, inkapsulacija se istraživala i u drugim područjima te je prvi puta industrijski primijenjena 1950. godine za dobivanje premaza osjetljivih na pritisak za proizvodnju fotokopirnog papira bez ugljika (Vladislavljevic, 2015).

Danas je inkapsulacija od velikog interesa, ne samo u medicinskom području, već i u području biotehnologije i farmaceutske industrije, za isporuku cjepiva i lijekova, ali također ima sve veću ulogu i u prehrambenoj industriji (Gürbüz i sur., 2020). Svrha primjene u prehrambenoj industriji može biti višestruka: i) učinkovitija isporuka bioaktivnih spojeva (antioksidansi, minerali, vitamini, fitosteroli, masne kiseline, polifenoli, itd.) i živih stanica (npr. probiotici), ii) prekrivanje neugodnih mirisa i aroma, iii) zaštita spojeva od degradacije pod utjecajem različitih štetnih okolišnih uvjeta (npr. utjecaj svjetla, vlage i kisika), iv) smanjenje isparavanja ili brzine prijenosa spojeva u okolinu, v) modifikacija fizikalnih svojstava materijala u svrhu lakšeg rukovanja, itd. (Saifullah i sur., 2019; Nedovic i sur., 2011; Fang i Bhandari, 2010). Među tehnikama inkapsulacije, u prehrambenoj industriji najčešće se koriste sušenje raspršivanjem, liofilizacija, prevlačenje u fluidiziranom sloju i ekstruzija (Gürbüz i sur., 2020; Singh i Dixit, 2014; Nedovic i sur., 2011).

Iako postoje različite kategorizacije inkapsulacijskih tehnika, najčešća je na fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i elektrohidrodinamičke (Slika 5).



Fizikalne tehnike	<ul style="list-style-type: none"> • sušenje raspršivanjem • liofilizacija • ekstruzija • prevlačenje u fluidiziranom sloju • inkapsulacija pomoću superkritičnih fluida
Fizikalno-kemijske tehnike	<ul style="list-style-type: none"> • ionsko geliranje • jednostavna ili kompleksna koacervacija • raspršivanjem hlađenjem • emulgiranje • inkapsulacija isparavanjem otapala • liposomalna inkapsulacija
Kemijske tehnike	<ul style="list-style-type: none"> • <i>in situ</i> polimerizacija • međufazna polimerizacija • međufazna polikondenzacija • međufazno umrežavanje
Elektrohidrodinamičke tehnike	<ul style="list-style-type: none"> • elektroispredanje • elektroraspršivanje

Slika 5. Podjela i primjeri inkapsulacijskih tehnika (Abedini i sur., 2023; Eun i sur., 2020)

Navedene tehnike većinom se koriste za inkapsulaciju jednog funkcionalnog sastojka, a posljednjih godina sve se više istražuju sustavi koji omogućuju isporuku više funkcionalnih sastojaka (tzv. koinkapsulirani sustavi). U tom kontekstu, naročito su zanimljive emulzije pošto se sastoje od vodene i uljne faze, od kojih je jedna kontinuirana, a druga dispergirana faza, te su stoga pogodne za inkapsulaciju i hidrofilnih i hidrofobnih bioaktivnih spojeva (Liu i sur., 2022a). Iako su konvencionalne emulzije tipa ulje-u-vodi trenutno najčešće korištene u prehrambenoj industriji, sve se više istražuje primjena tzv. naprednih emulzija, kao što su nanoemulzije, emulzije s velikom unutarnjom fazom, Pickeringove emulzije, višeslojne emulzije, čvrste lipidne nanočestice, emulgelovi i višestruke emulzije (Tan i McClements, 2021). Tako su primjerice, Chen i suradnici (2022) uspješno razvili Pickeringovu emulziju stabiliziranu feritinom za inkapsulaciju klorogenske kiseline, kao modelnog spoja hidrofilnog karaktera, i β -karotena, kao hidrofobnog modelnog spoja, a Zhou i suradnici (2021) uspješno su inkapsulirali kurkumin, resveratrol i kvercetin u nanoemulzije koristeći kokosovo, suncokretovo ili laneno ulje. Liposomi su, zbog prisutnosti lipidnih dvosloja u strukturi, također sami po sebi pogodni za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva različite polarnosti, ali u svrhu povećanja njihove stabilnosti i biorasploživosti, vrlo često se oblažu različitim ugljikohidratima i proteinima, koji se potom mogu koristiti kao nosači za druge bioaktivne spojeve (Liu i sur., 2022a). Kompleksna koacervacija poznata je od 1957. godine kada su Green i Schleicher objavili koacervaciju želatine iz svinjske kože pomoću arapske gume i od tada su objavljena mnoga istraživanja temeljena na ovoj tehnici, a u posljednje vrijeme ova tehnologija

prilagođava se drugim polimerima koji nisu životinjskog podrijetla, kao što su biljni proteini različitih žitarica, mahunarki i sjemenki (Muhoza i sur., 2022). Također, intenzivno se istražuje i koaksijalno elektroispredanje, koje je prvi puta predstavljeno 2003. godine u radu Sun i suradnika (2003), i kod kojeg se najčešće koriste dva različita nosača kako bi se proizvela nanovlakna s morfologijom jezgre i omotača (Yoon i sur., 2018). Lan i suradnici (2021) uspješno su formulirali nanovlakna koaksijalnim elektroispredanjem s inkapsuliranim polifenolima čaja i L-lizina sa sintetskim polimerima, polivinil alkoholom i poli (ϵ -kapolaktonom), kao nosačima, a Torkamami i suradnici (2018) koristili su prirodne polimere, želatinu i zein, za inkapsulaciju ekstrakta gorke dinje istom tehnikom. Kitozan, etil celuloza, škrob, proteini sirutke, poli (etilen oksid) i polikaprolakton još su neki od primjera nosača koji su uspješno primijenjeni u inkapsulaciji bioaktivnih spojeva elektroispredanjem (Coelho i sur., 2021). Uz elektroispredanje, izrazito zanimljiva elektrohidrodinamička tehnika je elektroraspršivanje i među primjerima uspješne inkapsulacije su formulacija nanočestica antocijana borovnica, uz zein kao nosač (González-Cruz i sur., 2021), te nanočestica glukozinolata i polifenolnih spojeva ekstrakta brokule, također uz zein kao nosač (Radünz i sur., 2020). Inkapsulacija tekuće-tekuće kao najnovija tehnika, predstavljena je u radu Misra i suradnika (2020) gdje se kapljica koja sadrži aktivni spoj uvodi kroz mlaznicu na drugu tekućinu koja na površini sadrži tekući međufazni sloj koji tijekom prolaska obavije jezgru kapljice s aktivnim spojem.

Vrijednost globalnog tržišta inkapsulacije u prehrambenoj industriji za 2023. godinu procijenjena je na 5952,8 milijuna USD, a do 2033. godine očekuje se vrijednost od 14547,9 milijuna USD sa složenom stopom godišnjeg rasta od 9,3 %. Tržište inkapsulacije u tom području trenutno pokreće rastuća potreba za „inkapsuliranim okusima“ jer potrošači žele hranu s dugotrajnim okusom, kao i sve veća potrošnja i potražnja za funkcionalnim i obogaćenim prehrambenim proizvodima (Future Market Insights, 2023).

Pregledom prehrambenih proizvoda plasiranih na tržište uočava se još relativno mala zastupljenost sastojaka u inkapsuliranom obliku i oni su uglavnom vezani uz neke osnovne sastojke proizvoda, dok su bioaktivni sastojci zastupljeni tek u sporadičnim ili nekim eksperimentalnim prototipovima proizvoda.

Tako je primjerice tvrtka TasteTech (UK) razvila inkapsulate sladila (acesulfam K, aspartam, stevija, sukraloza, mješavina acesulfama K i sukraloze te aspartama i acesulfama K) za inkorporaciju u gume za žvakanje, i inkapsulate kiselina (limunska, sorbinska, vinska, jabučna i askorbinska kiselina), koje su, osim za gume za žvakanje, prikladne i za druge konditorske i



pekarske proizvode. Ista tvrtka proizvela je i inkapsulate različitih pekarskih (prašak za pecivo, kalcijev propionat i natrijev hidrogenkarbonat) i funkcionalnih (kafein, vitamin D i vitamin C) sastojaka, a u tu svrhu proizvodi monojezgrene i višejezgrene čestice, a koristi i sušenje raspršivanjem (Anonymous 4). Tvrtka Balchem (SAD) razvila je proizvode linije ConfecShure[®], koji sadrže inkapsuliranu jabučnu, limunsku, vinsku, adipinsku i fumarnu kiselinu, a namijenjeni su inkorporaciji u bombone i gume za žvakanje te omogućavaju ravnotežu okusa, štite od nepoželjnih interakcija sastojaka i sprečavaju inverziju šećera tijekom skladištenja. Ista tvrtka razvila je i proizvode linije BakeShure[®], s inkapsuliranim bazama za dizanje tijesta i kiselinama, koji sprečavaju degradaciju proteina, povećavaju aktivnost kvasca i volumen pekarskih proizvoda te produžuju rok trajanja. Razvijeni su i proizvodi linije Meat Shure[®], s inkapsuliranim sredstvima za kiseljenje, kao alternativa tradicionalnim metodama fermentacije, i inkapsuliranim natrijevim kloridom, čime se kontrolira sinereza i usporava pojava užeglosti uslijed oksidacije (Anonymous 5). Tvrtka Inovia (Austrija) bavi se razvojem novih proizvoda inkapsulacijom te su tako razvili inkapsulat ulja konoplje sušen raspršivanjem za primjenu u kapsule, tablete, instant mješavine i napitke (Anonymous 6). Tvrtka Lycored (Izrael) proizvodi inkapsulate uz alginat, škrob i želatinu kao nosače, te su, između ostalog, u svrhu inkorporacije u bombone, razvili inkapsulate astaksantina, α - i β -karotena, luteina, likopena, kafeina, vitamina C, B9 i E, bakra, molibdena i metionina (Anonymous 7).

Iako su polifenoli izrazito poželjni sastojci svih prehrambenih proizvoda, niska bioraspoloživost često je ograničavajući faktor njihove šire primjene, posebice u svrhu razvoja formulacija novih prehrambenih proizvoda obogaćenih polifenolima.

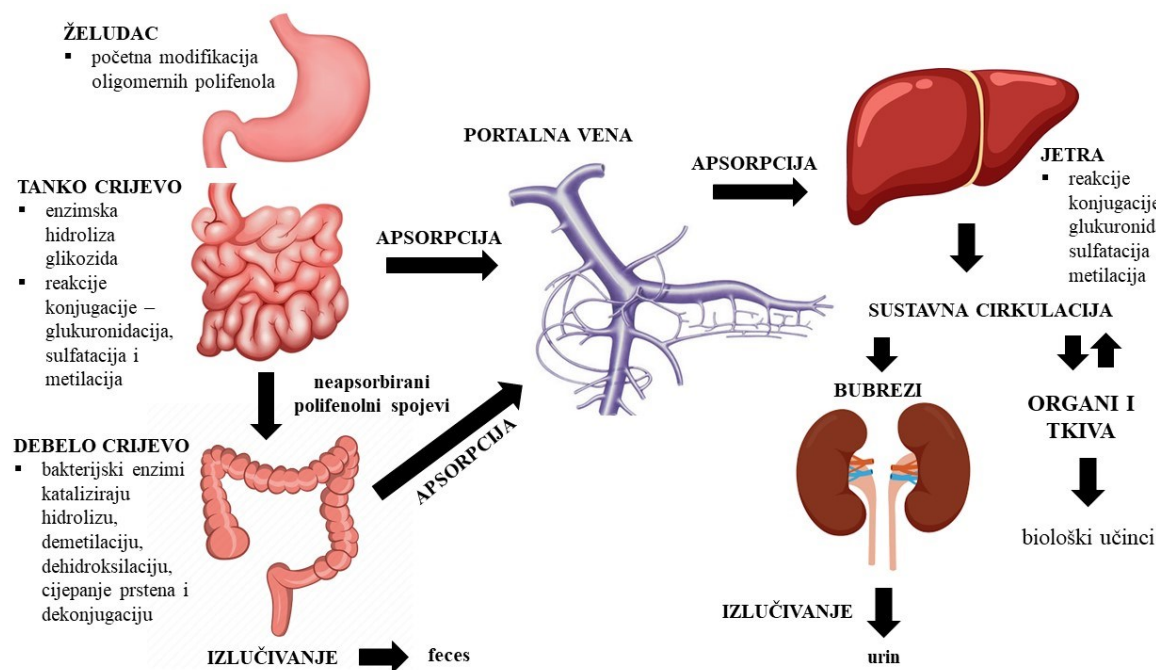
2.4.1. Metabolizam polifenola i utjecaj inkapsulacije na njihovu bioraspoloživost

Za razvoj inkapsulacijskih sustava ciljane isporuke bioaktivnih spojeva, kao i za povećanje njihove bioraspoloživosti, potrebno je razumjeti fiziološko i fizikalno-kemijsko okruženje u ljudskom probavnom sustavu, kao i njihov metabolizam.

Da bi konzumacija bioaktivnih spojeva postigla učinak u organizmu, u određenim tkivima ili organima, bioaktivni spojevi moraju biti bioraspoloživi, tj. učinkovito apsorbirani iz crijeva u sustavnu cirkulaciju i dostavljeni na odgovarajuće mjesto u tijelu. Polifenolni spojevi su u hrani većinom prisutni u obliku estera, glikozida ili polimera koji se ne apsorbiraju izravno nego se prije apsorpcije hidroliziraju enzimskim reakcijama te podvrgavaju reakcijama konjugacije u tankom crijevu te putem portalne vene aktivnim, pasivnim ili olakšanim transportom dopijevaju u jetru gdje se također podvrgavaju reakcijama konjugacije, nakon čega ulaze u



sustavnu cirkulaciju te do organa i tkiva gdje vrše biološke učinke. Veze polifenolnih spojeva sa šećerima (glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza, itd.) povećavaju njihovu topljivost u vodi i ograničavaju transport pasivnom difuzijom. Samo 5 – 10 % ukupnih polifenolnih spojeva može se apsorbirati u tankom crijevu i dalje metabolizirati, dok se ostatak polifenola može akumulirati u debelom crijevu i izlučiti fecesom (Slika 6) (Chen i sur., 2018).



Slika 6. Apsorpcija, metabolizam i izlučivanje polifenolnih spojeva (Minatel i sur., 2017)

Prvi korak u apsorpciji i metabolizmu polifenolnih spojeva predstavlja žvakanje u usnoj šupljini gdje dolazi do miješanja hrane sa slinom koja se pretežno sastoji od vode (99,5 %), zatim od elektrolita, proteina (glikoprotein mucin, albumini, imunoglobulini, laktoferin), antibakterijskih spojeva (sekretorni imunoglobulin (IgA) i lizozim), hormona, nukleinskih kiselina, dušičnih spojeva (mokraćna kiselina, urea i amonijak), antioksidansa (askorbat i glutation) i probavnih enzima (α -amilaza). Smatra se da stupanj glikozilacije polifenolnih spojeva i interakcija s proteinima sline utječe na otpuštanje polifenola iz matriksa hrane te na njihovu apsorpciju i biodostupnost u daljnjim koracima, budući da može doći do njihove precipitacije s proteinima smanjujući time njihovu bioraspoloživost.

Biodostupnost se definira kao količina bilo kojeg sastojka hrane koji je vidljivo prisutan u crijevima kao posljedica otpuštanja iz matriksa hrane i koji bi mogao proći kroz crijevnu barijeru. S druge strane, bioraspoloživost je definirana kao udjel biodostupnih spojeva koji se apsorbiraju i ulaze u krvotok tako da se mogu distribuirati i metabolizirati unutar tjelesnih organa. Bolus hrane, formiran u ustima, peristaltikom se dalje prenosi u želudac i pretvara u



himus. Hrana se zadržava u želucu 0,3 – 2 sata, a tijekom tog razdoblja djelovanjem kiselina i miješanjem dolazi do razgradnje žvakane hrane što pomaže u oslobađanju polifenolnih spojeva iz matriksa hrane. Niska pH vrijednost želuca utječe na otpuštanje polifenolnih spojeva, naročito onih s malim brojem i/ili slabim vezama s matriksom hrane. Kiselo okruženje u želucu može potaknuti hidrolizu i/ili transformaciju polifenolnih spojeva, kao što je hidroliza oligomera proantocijanidina ili cijepanje dijelova šećera vezanih za strukturu polifenola. Iako želudac nije glavno mjesto za apsorpciju polifenolnih spojeva, jednostavniji polifenolni spojevi poput fenolnih kiselina, koji nisu čvrsto vezani za matriks hrane ili su dostupni za apsorpciju u želucu, mogu biti apsorbirani od želučanih stanica. Prvi dio tankog crijeva – dvanaesnik, i jejunum su glavna mjesta apsorpcije i transformacije polifenolnih spojeva. Himus se transportira iz želuca u dvanaesnik mijenjajući pH vrijednost iz kisele u alkalnu zbog neutralizacije putem žuči i soka gušterače čime polifenolni spojevi postaju nestabilniji (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Čimbenici koji utječu na apsorpciju u tankom crijevu su fitokemijski, poput strukture molekula, lipofilnosti, pKa i topljivosti te biološki poput pH lumena i permeabilnosti membrane (Spencer, 2003). Glikozilirani polifenolni spojevi koji su hidrofilniji od odgovarajućih aglikona ne mogu lako prijeći staničnu membranu enterocita putem pasivne difuzije. Pretpostavlja se da se glikozilirani polifenolni spojevi apsorbiraju kroz nekoliko mehanizama. Prema prvom mehanizmu, glikozidne dijelove cijepa laktaza florizin hidrolaza, enzim na površini enterocita, koji je vrlo reaktivan prema flavonoid-*O*- β -D-glikozidima. Lipofilni aglikonski produkti mogu tada prijeći staničnu membranu putem pasivne difuzije. Prema drugom mehanizmu, glikozilirani polifenolni spojevi prenose se kroz staničnu membranu enterocita putem aktivnog prijenosnika glukoze ovisnog o natriju (engl. *sodium-dependent glucose transporter* - SGLT1) te se u enterocitima podvrgavaju hidrolizi pomoću citosolne β -glukozidaze kako bi se uklonile glikozidne jedinice (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Polifenoli vezani za ramnozu se prije apsorpcije u debelom crijevu hidroliziraju pomoću ramnozidaze koju izlučuje crijevna mikrobiota (Chen i sur., 2018). Unutar citosola enterocita, aglikoni polifenolnih spojeva se ili prenose u krvotok putem pasivne difuzije do jetre gdje se transformiraju pomoću enzima ili se transformiraju unutar citosola enterocita tankog crijeva. Transformacija uključuje konjugaciju polifenola kroz reakcije glukuronidacije, sulfatacije i metilacije koje kataliziraju pretežno tri enzima - UDP-glukuronozil transferaza, sulfotransferaza i katehol-*O*-metiltransferaza (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Nakon reakcija konjugacija, metaboliti polifenola odlaze u plazmu nakon čega se izlučuju putem bubrega u urin ili se transportiraju u debelo crijevo. U debelo crijevo dopijeva velik broj unesenih polifenola (80 – 90 %), uključujući one koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu i one



polifenole koji su se apsorbirali i metabolizirali. Debelo crijevo sadrži bogatu mikrobiotu s 10^{12} mikroorganizama g^{-1} , koja ima veliku katalitičku i hidrolitičku sposobnost, što dovodi do razgradnje polifenola i nastajanja velikog broja novih metabolita. Bakterijski enzimi debelog crijeva kataliziraju hidrolizu, demetilaciju, dehidroksilaciju, cijepanje prstena i dekonjugaciju. Nastali produkti mogu ili ući u sustavnu cirkulaciju ili izvršiti biološka djelovanja u stanicama debelog crijeva. S obzirom na njihovo antimikrobno djelovanje, polifenolni spojevi mogu pozitivno djelovati na zdravlje debelog crijeva kao prebiotici (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). Polifenolni spojevi i njihovi metaboliti eliminiraju se kroz urin i feces (Minatel i sur., 2017).

Inkapsulacija može poboljšati bioraspoloživost polifenolnih spojeva pružanjem zaštite u želučanom okruženju formuliranjem sustava koji reagiraju na intestinalni pH što u konačnici omogućuje njihovu stabilnost u želucu i produženo otpuštanje u tankom crijevu. Biopolimerni nosači se u inkapsulacijskom sustavu razgrađuju djelovanjem amilaze, proteaze i lipaze, nakon čega razgrađene sastojke i oslobođene polifenolne spojeve epitelne stanice koriste za daljnju apsorpciju (Liu i sur., 2022a). Granata i suradnici (2018) formulirali su nanoinkapsulate hidroksicimetnih kiselina (ferulinska, kafeinska, sinapinska i *p*-kumarinska kiselina), koristeći poli- ϵ -kaprolakton, i *in vitro* testovima dokazali stabilnost inkapsulata tijekom simulirane probave u želucu i otpuštanje fenolnih kiselina tijekom probave u tankom crijevu. Inkapsulacija polimetoksiflavona u emulzije s velikom unutarnjom fazom, uz izolate proteina sirutke i niskometiliranog pektina kao stabilizatore, rezultirala je povećanjem njihove bioraspoloživosti u uvjetima *in vitro* probave, i do 5 puta, u istraživanju Wijaya i suradnika (2020). U istraživanju Panwar i suradnika (2018), ferulinska kiselina je u inkapsuliranom obliku, pripremljenom ionskim geliranjem s kitozonom kao nosačem, u *in vivo* istraživanjima na štakorima pokazala duže zadržavanje u plazmi u usporedbi sa slobodnim, neinkapsuliranim oblikom, indicirajući povećanje njene bioraspoloživosti u inkapsuliranom obliku. Povećanje bioraspoloživosti ružmarinske kiseline u fosfolipidnom inkapsulacijskom sustavu *in vivo* dokazano je u radu Yang i suradnika (2015), kao i povećanje apsorpcije polifenola čaja kontroliranim otpuštanjem iz nanoemulzija u probavnom sustavu štakora u radu Peng i suradnika (2018). Oralna primjena nanočestica resveratrola, pripremljenih koacervacijom uz kazein kao nosač, na štakorima, rezultirala je i do 10 puta većom bioraspoloživošću u istraživanju Peñalva i suradnika (2018). Isto tako, u istraživanju Li i suradnika (2023), inkapsulacija karotenoida torularhodina u emulziju s izolatom proteina sirutke i visokometiliranim pektinom omogućila je njegovu veću bioraspoloživost.

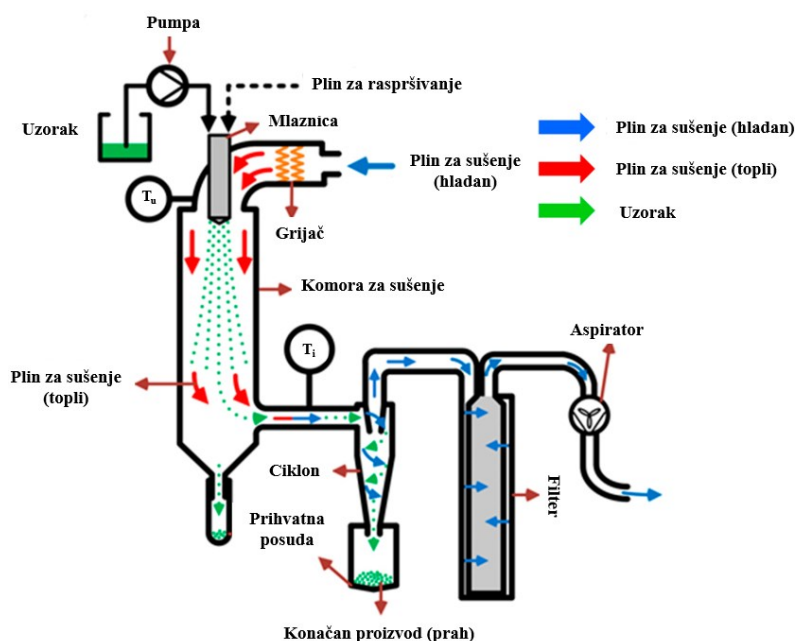


2.4.2. Sušenje raspršivanjem

Princip sušenja raspršivanjem prvi puta je objavljen 1872. godine u patentu Samuela Perry-a, a 20-ih godina prošlog stoljeća ta tehnika je komercijalizirana za proizvodnju mlijeka u prahu (Santos i sur., 2018; Bhandari i sur., 2008). I danas, sušenje raspršivanjem smatra se najpogodnijom tehnikom sušenja za dobivanje čvrstih ili polučvrstih uzoraka iz tekućih materijala (Murugesan i Orsat, 2012), a ujedno i najekonomičnijom zbog niskih operativnih rashoda. Naime, na industrijskoj razini, sušenje raspršivanjem je ekonomičnije od liofilizacije zbog manje potrošnje električne energije i kraćeg vremena sušenja (Hammami i René, 1997), a slično je uočeno u usporedbi s vakuum sušenjem (Santivarangkna i sur., 2007).

U svrhu inkapsulacije, sušenje raspršivanjem prvi puta je primijenjeno 30-ih godina prošlog stoljeća za inkapsulaciju spojeva arome, uz arapsku gumu kao nosač (Álvarez i Pando, 2021), i do danas, kao najstarija komercijalna tehnika inkapsulacije, ima najširu primjenu u prehrambenoj industriji.

Osnovne faze sušenja raspršivanjem su: i) raspršivanje tekućeg materijala (otopine ili suspenzije), ii) kontakt materijala s grijanim zrakom za sušenje, iii) sušenje materijala i formiranje čestica te iv) odvajanje konačnog proizvoda od zraka. Svi spomenuti koraci i pripadajuća procesna svojstva, kao i svojstva ulaznih procesnih tokova, značajno utječu na svojstva konačnog proizvoda (Mohammed i sur., 2020). Shematski prikaz sušionika s raspršivanjem prikazan je na Slici 7.



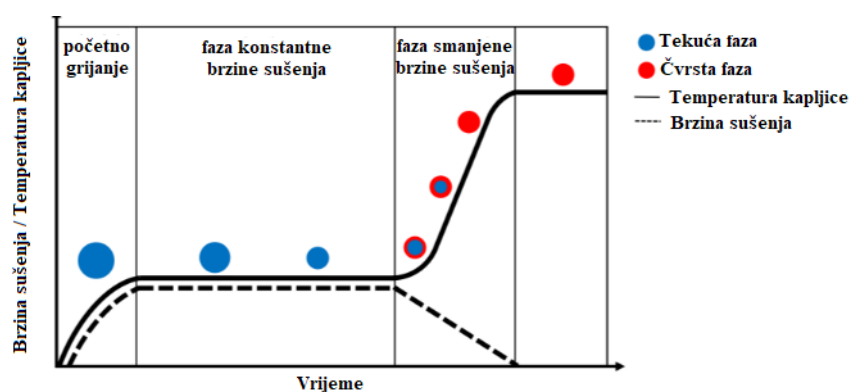
Slika 7. Shematski prikaz sušionika s raspršivanjem (prema Piñón-Balderrama i sur., 2020)



Raspršivanje predstavlja pretvorbu tekućine u kolektiv kapljica bliskih veličina što rezultira boljim prijenosom topline i tvari u fazi sušenja, kao i povećanjem površine čestica materijala i dobrom raspodjelom materijala unutar komore za sušenje (Murugesan i Orsat, 2012). Povećanje površine čestica dovodi do brzog isparavanja otapala i stvaranjem kore, sušeći materijal u vrlo kratkom vremenu. Postoje različite vrste raspršivača, kao što su rotacijski raspršivači, tlačne mlaznice, pneumatske mlaznice i zvučne mlaznice, a njihov odabir vrši se na temelju materijala koji se suši i o željenoj veličini čestica finalnog proizvoda (Mohammed i sur., 2020).

Nastale kapljice dolaze u kontakt s filtriranim zrakom, zagrijanim u skladu s procesnim uvjetima, a ponekad se koriste dušik ili drugi inertni plinovi, ovisno o nestabilnosti materijala koji se suši ili njegovoj osjetljivosti na kisik. Kod istostrujnog načina sušenja, raspršivač je smješten na vrhu komore za sušenje, zajedno s ulazom za vrući zrak, te se materijal raspršuje u istom smjeru kao i vrući zrak, dok se kod protustrujnog načina sušenja, materijal i vrući zrak uvode u sustav sa suprotnih krajeva komore (Murugesan i Orsat, 2012).

Nakon raspršivanja slijedi sušenje i stvaranje čestica jer se toplina vrućeg zraka prenosi na kapljice i pretvara u latentnu toplinu tijekom isparavanja otapala iz kapljica (Mohammed i sur., 2020). Sušenje započinje na površini kapljice te molekule otapala migriraju iz središta kapljice prema površini. Migracija molekula otapala odvija se molekularnom difuzijom u odnosu na otopljenu tvar, konvekcijom tekućine unutar kapljice ili kapilarnim protokom otapala kroz čvrstu poroznu matricu. Ako uvjeti sušenja ostanu nepromijenjeni, brzina sušenja je konstantna i kontrolirana samo prijenosom topline prema površini kapljice te se ova faza naziva fazom konstantne brzine sušenja (Slika 8).



Slika 8. Brzina sušenja i temperatura kapljice tijekom sušenja raspršivanjem (prema Boel i sur., 2020)

Isparavanjem otapala s površine kapljice, koncentracija otopljene tvari na površini raste, a rastući koncentracijski gradijent uzrokuje difuziju otopljene tvari od površine kapljice prema središtu kapljice. Brzina difuzije otopljene tvari prema središtu kapljice postaje manja od brzine redukcije promjera kapljice zbog konstantnog gubitka otapala te dolazi do stvaranja kore zbog obogaćivanja otopljenom tvari na površini kapljice što dovodi do smanjene brzine sušenja. U ovoj fazi sušenja, u kapljici postoji porozna čvrsta kora i unutarnja mokra jezgra. Brzina sušenja kontrolirana je brzinom difuzije ili brzinom kapilarnog toka otapala iz mokre jezgre kroz pore kore. Usporeno isparavanje otapala rezultira skupljanjem mokre jezgre i značajnim rastom kore prema središtu kapljice. Zadebljanje kore će dovesti do povećanja otpora za prijenos mase i time postupnog smanjenja brzine sušenja. Stoga, ova faza naziva se fazom smanjene brzine sušenja (Slika 8) u kojoj temperatura površine čestice raste dok ne postigne temperaturu zraka u komori (Boel i sur., 2020).

Posljednja faza sušenja raspršivanjem je odvajanje konačnog proizvoda – čestica, od zraka za sušenje, u ciklonu. Sušenje raspršivanjem završava kada osušene čestice padnu na dno komore za sušenje gravitacijskim djelovanjem (Mohammed i sur., 2020).

Vrijeme sušenja ovom tehnikom, zbog velike brzine isparavanja, izuzetno je kratko i najčešće iznosi 5 – 100 sekundi. Proizvod dobiven sušenjem raspršivanjem, koji može biti u obliku granula, praša ili aglomerata, izrazito je stabilan u pogledu mikrobiološke i oksidacijske degradacije (npr. reakcije posmeđivanja, hidrolitičke reakcije, autooksidacija, oksidacija lipida, itd.) zbog niskih vrijednosti aktiviteta vode i udjela vode. Ipak, zbog primjene visokih temperatura može se pojaviti degradacija određenih termolabilnih spojeva (npr. enzimi i vitamini). Naime, temperatura ulaznog zraka najčešće iznosi 150 – 220 °C, a temperatura izlaznog zraka 50 – 80 °C (Shishir i Chen, 2017).

Ukoliko se sušenje raspršivanjem koristi kao tehnika inkapsulacije, potrebno je pripremiti otopinu nosača i aktivne tvari u odgovarajućem otapalu, najčešće u vodi, te dobro provesti homogenizaciju pripremljene otopine koja se zatim uvodi u sustav za sušenje raspršivanjem (obično peristaltičkom pumpom) i prolazi kroz sve navedene faze (Boel i sur., 2020). Da bi se postigla visoka inkapsulacijska učinkovitost aktivne tvari i željena kvaliteta čestica, uvjeti sušenja raspršivanjem trebaju biti optimirani. Na inkapsulacijsku učinkovitost utječu fizikalno-kemijska svojstva nosača i aktivne tvari te njihove otopine (npr. viskoznost, ukupna suha tvar, itd.), procesni uvjeti, kao što su ulazna i izlazna temperatura zraka, vlažnost zraka, protok zraka, vrsta raspršivanja, promjer mlaznice, širina i dužina komore za sušenje, itd. (Assadpour i Jafari, 2019). Sušenje raspršivanjem pokazalo se kao pogodna tehnika inkapsulacije za



različite bioaktivne spojeve, uključujući i polifenolne spojeve, osiguravajući inkapsulate prikladnih fizikalno-kemijskih svojstava s visokom učinkovitošću zadržavanja polifenola, kao i njihove stabilnosti tijekom skladištenja. Pregled literaturnih podataka na temu inkapsulacije polifenolnih spojeva biljnoga podrijetla sušenjem raspršivanjem, u posljednjih 5 godina, zajedno s procesnim uvjetima, naveden je u Tablici 4.

Tablica 4. Pregled znanstvenih istraživanja vezanih uz inkapsulaciju polifenolnih spojeva biljnoga podrijetla sušenjem raspršivanjem, u posljednjih 5 godina

Nosač	Inkapsulirani sastojak	Procesni uvjeti*	Inkapsulacijska učinkovitost	Prinos	Referenca
Karboksimetil celuloza (0,8 %) i u kombinaciji s hidrolizatom kolagena, arapskom i guar gumom i κ -karagenanom	Ekstrakt trave ive	$P_z=831 \text{ L h}^{-1}$, $T_u=150 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_i=90 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=1,2 \text{ mL min}^{-1}$	Hidroksicimetne kiseline: 68,7 – 97,3 %	32,6 – 55,0 %	Mandura Jarić i sur. (2023a)
Albumin, maltodekstrin, arapska guma i njihove mješavine (20 %)	Ekstrakt taloga kave	$T_u=160 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_i=60 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=2 \text{ mL min}^{-1}$	Ukupni polifenoli: 52,0 – 83,4 %	/	Araújo i sur. (2022)
Maltodekstrin (16,9 g/100 g)	Ekstrakt koprive	$T_u=150 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=3,4 \text{ mL min}^{-1}$	Ukupni polifenoli: 84,1 %	38,5 %	Kalajahi i Ghandiha (2022)
Maltodekstrin (20 %)	Ekstrakt cvijeta srebrne lipe	$P_z=600 \text{ L h}^{-1}$, $T_u=170 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=10,5 \text{ mL min}^{-1}$	Ukupni polifenoli: 95,9 i 93,4 % Kvercetin: 65,1 i 75,2 Kemferol: 65,2 i 77,1 %	57,9 i 59,2 %	Mainente i sur. (2022)
Maltodekstrin (40 %), arapska guma (20 %) i rezistentni maltodekstrin (40 %)	Ekstrakt lista murve	$T_u=155 \text{ }^\circ\text{C}$ $T_i=90 \text{ }^\circ\text{C}$	Ukupni polifenoli: 70,3 – 97,0 %	37,9 – 74,0 %	Insang i sur. (2022)
Guar guma (0,5 %), arapska guma, pektin, alginat (4 %), inulin, maltodekstrin (10 %)	Ekstrakt maslačka	$P_z=600 \text{ L h}^{-1}$, $T_u=130 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_i=66 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_o=8 \text{ mL min}^{-1}$	Ukupni polifenoli: 17,2 – 63,6 % Čikorinska kiselina: 23,2 – 74,4 %	48,5 – 86,8 %	Martinić i sur. (2022)



Tablica 4. Pregled znanstvenih istraživanja vezanih uz inkapsulaciju polifenolnih spojeva biljnoga podrijetla sušenjem raspršivanjem, u posljednjih 5 godina – nastavak

Nosač	Inkapsulirani sastojak	Procesni uvjeti*	Inkapsulacijska učinkovitost	Prinos	Referenca
Maltodekstrin (19 %) i u kombinaciji (17 %) s guar gumom, α -, β - i γ -ciklodekstrinom (2 %)	Ekstrakt <i>Syzygium zeylanicum</i> L.	$T_u=140$ °C, $T_i=97,3$ °C, $P_o=120$ mL h ⁻¹	Ukupni polifenoli: 97,2 – 97,9 %	58,3 – 70,5 %	Nguyen i sur. (2022)
Hidroksipropil beta-ciklodekstrin (2,2 %)	Ekstrakt trske od grožđa	$P_z=473$ L h ⁻¹ , $T_u=130$ °C, $T_i=71$ °C, $P_o=6-7$ mL min ⁻¹	Restritizol: 97,0 %	83,8 %	Escobar-Avello i sur. (2021)
Maltodekstrin i proteini sirutke (20 %)	Ekstrakt vrbolike	$P_z=75$ m ³ h ⁻¹ , $T_u=130$ °C, $T_i=80$ °C, $P_o=10,8$ mL min ⁻¹	Ukupni polifenoli: 75,8 i 92,0 % Ukupni flavonoidi: 93,0 i 94,3 %	63,8 i 61,2 %	Jovanović i sur. (2021a)
Želatina (5 %)	Ekstrakt majčine dušice	$T_u=140$ °C, $T_i=72-75$ °C, $P_o=30$ %	Ukupni polifenoli: 23,7 – 48,7 % Ukupni flavonoidi: 24,0 – 43,9 %	17,9 – 21,7 %	Jovanović i sur. (2021b)
Modificirani kizozan, natrijev alginat i arapska guma (1 %)	Ekstrakt bazge	$P_z=36$ m ³ h ⁻¹ , $T_u=115$ °C, $T_i=58$ °C, $P_o=4$ mL min ⁻¹	Ukupni polifenoli: 92,3 – 99,8 %	25 – 41 %	Riberio i sur. (2019)
APSUL® modificirani škrob (15 %)	Ekstrakt crvenog kupusa i radiča	$P_z=40$ m ³ h ⁻¹ , $T_u=140$ °C, $T_i=70$ °C, $P_o=5$ mL min ⁻¹	Ukupni polifenoli: 79 i 88 %	95 – 99 %	Zanoni i sur. (2019)
Maltodekstrin, arapska guma i izolat proteina sirutke (15 %)	Ekstrakt crne riže	$P_z=0,67$ m ³ h ⁻¹ , $T_u=180$ °C, $T_i=70-80$ °C, $P_o=6$ mL min ⁻¹	Antocijani: oko 80 – 100 %	/	Norkaew i sur. (2019)

* P_z -protok zraka; T_u -ulazna temperatura; T_i -izlazna temperatura; P_o -protok otopine



2.4.2.1. Nosači u sušenju raspršivanjem

Materijal koji se koristi kao nosač kod sušenja raspršivanjem, prije svega mora biti netoksičan i nealergen za ljude, a poželjno je da je bez okusa ili blagog okusa (Coimbra i sur., 2020). Uz to, mora imati visoku topljivost, nisku higroskopnost i izraženu sposobnost maskiranja okusa, a u obliku koncentriranih otopina mora imati relativno nisku viskoznost što će omogućiti uspješno sušenje raspršivanjem (Lu i sur., 2021). Kao nosači za sušenje raspršivanjem mogu se koristiti biopolimeri širokog raspona molekulske mase, od onih manje mase, kao što su ciklodekstrini (1 – 2 kDa) (Di i Kerns, 2016), do biopolimera veće molekulske mase, kao što je škrob, čije su strukturne jedinice, amiloza i amilopektin, u rasponu masa 10^5 - 10^7 Da (Domene-López i sur., 2019), a najčešće se koriste maltodekstrin, arapska guma i proteini mlijeka (Coimbra i sur., 2020).

Kako bi proces sušenja raspršivanjem bio što uspješniji i kako bi se osigurao inkapsulat poželjnih fizikalno-kemijskih i bioaktivnih svojstava, vrlo često se koriste binarni sustavi nosača ili otopine više nosača koji djeluju sinergistički. Bao i suradnici (2023) postignuli su višu inkapsulacijsku učinkovitost (> 90 %) eteričnog ulja i polifenola komine grožđa inkorporacijom sluzi žute gorušice u sustav nosača s maltodekstrinom i arapskom gumom, dok su Almeida i suradnici (2023) inkorporacijom proteina rižinih mekinja u sustav nosača s maltodekstrinom postigli i do 3 puta višu inkapsulacijsku učinkovitost antocijana grejpa sušenjem raspršivanjem. U istraživanju Balci-Torun (2023) zabilježen je visoki udjel linaloola (oko 20 – 30 mg g⁻¹) i karvakrola (oko 40 – 55 mg g⁻¹), iz eteričnog ulja turskog origana, u inkapsulatima sušenim raspršivanjem inkorporacijom β-ciklodekstrina u sustav s maltodekstrinom i arapskom gumom. Tamtürk i suradnici (2023) koristili su aquafabu (tekućina nastala kuhanjem slanutka, graha, graška i drugih mahunarki) i deaktivirani pekarski kvasac, kao inovativne nosače za sušenje raspršivanjem, uz inulin i maltodekstrin, za inkapsulaciju biomase mikroalge *Chlorella vulgaris*. Najvišu učinkovitost inkapsulacije (> 90 %) klorofila i karotenoida biomase postigli su s otopinom koja je sadržavala 25 % biomase i 75 % pekarskog kvasca. Zanimljivo je i istraživanje Halahlah i suradnika (2023) koji su inkapsulacijom soka od borovnice, uz hemicelulozu drva kao inovativni nosač, postigli visoku inkapsulacijsku učinkovitost (71 – 73 %) antocijana borovnice. Vimercati i suradnici (2022) koristili su albumin jajeta s maltodekstrinom i arapskom gumom za inkapsulaciju polifenola srebrne pokožice kave i primjenom dvije dodatne tehnike (liofilizacija i sušenjem pjenom), pri čemu je najviša inkapsulacijska učinkovitost (oko 80 %) postignuta sušenjem raspršivanjem. Espinosa-Andrews i suradnici (2023) proizveli su emulziju ribljeg ulja s mesquite gumom i



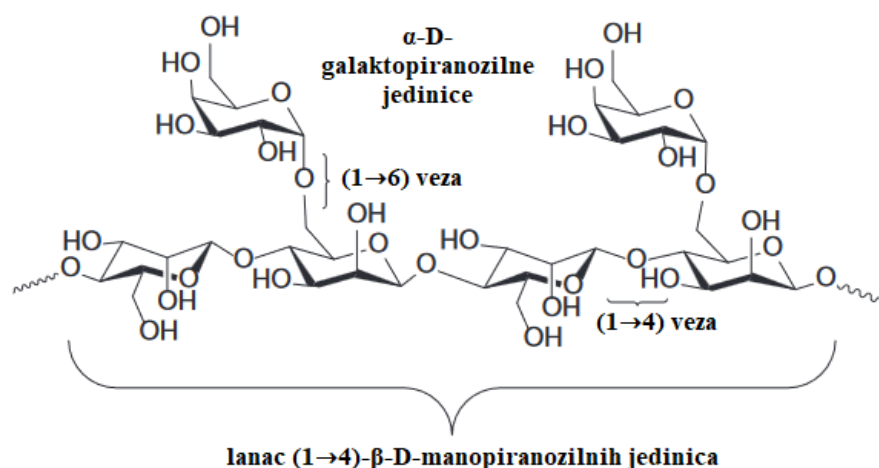
kitozanom i nakon sušenja raspršivanjem odredili inkapsulacijsku učinkovitost ribljeg ulja od 93 %. Augustin i suradnici (2006) predložili su čak korištenje produkata Maillard-ovih reakcija za poboljšanje svojstava proteina i ugljikohidrata, kao nosača za inkapsulaciju ribljeg ulja sušenjem raspršivanjem. Riblje ulje su emulgirali u vodenoj otopini koja je sadržavala izvor proteina (natrijev kazeinat, izolat proteina sirutke, izolat proteina soje ili obrano mlijeko u prahu) i ugljikohidrata (glukoza, osušeni glukozni sirup ili oligosaharidi) te su takve otopine podvrgnuli sušenju raspršivanjem. Visoka inkapsulacijska učinkovitost, u pogledu niskog udjela ekstraktabilnog ulja u prahovima (< 2 % praha), određena je u uzorku uz kombinaciju nosača natrijev kazeinat, glukoza i osušeni glukozni sirup.

Uz primjenu različitih kombinacija nosača, u otopinu nosača mogu se uvesti i emulgatori, plastifikatori, antioksidansi, itd., kako bi se istaknule njihove prednosti ili eliminirali nedostaci, a vrlo često u tu svrhu se provode i različite modifikacije biopolimera (Lu i sur., 2021). Tako su primjerice, Peng i suradnici (2010) sintetizirali derivat kitozana "mPEG-g-CS", u svrhu povećanja njegove topljivosti, kao novi nosač za inkapsulaciju ulja morskih algi sušenjem raspršivanjem i postigli inkapsulacijsku učinkovitost od 94 %. Kalajahi i suradnici (2023) objavili su da djelomična enzimaska hidroliza proteina sirutke djeluje pozitivno na svojstva tog nosača tijekom sušenja raspršivanjem budući da je, u kombinaciji s maltodekstrinom, isti doprinio očuvanju antioksidacijskih svojstava ekstrakta japanske lijeske te fizikalnih svojstava inkapsulata, uz istovremeno postizanje visokih prinosa inkapsulacije. Zhang i suradnici (2022) modificirali su škrob s oktenil sukcinil anhidridom kojeg su potom koristili u binarnom sustavu s proteinima sirutke za inkapsulaciju kapsaicina sušenjem raspršivanjem, ali je povećanje udjela tog modificiranog škroba u sustavu nosača rezultiralo smanjenjem inkapsulacijske učinkovitosti kapsaicina.

2.4.2.2. Guar guma

Guar guma je skladišni polisaharid iz sjemenki mahunarke guar (*Cyamopsis tetragonolobusa*, porodica Leguminosae). Sadrži oko 80 % galaktomanana, 12 % vode, 5 % proteina, 2 % pepela netopljivog u kiselini, 0,7 % pepela i 0,7 % masti (George i sur., 2019). Galaktomananski polimer sastoji se od linearnog dijela međusobno povezanih (1→4)-β-D-manopiranozilnih jedinica, na koje su bočno vezane D-galaktopiranozilne jedinice α-(1→6) vezom (Slika 9). Omjer jedinica manoze i galaktoze u guar gumi približno je 2:1 (Verma i Sharma, 2021).





Slika 9. Kemijska struktura guar gume (prema Verma i Sharma, 2021)

Guar guma je prirodni polisaharid s molarnom masom u rasponu od 10^6 do 2×10^6 g mol⁻¹, koja je među najvećima u usporedbi s drugim prirodnim polisaharidima topivima u vodi. Svojstva guar gume uglavnom ovise o kemijskim svojstvima, kao što su duljina lanca, brojnost *cis*-OH skupina, steričke prepreke, stupanj polimerizacije, prisutnost supstituenata, itd. Guar guma pokazuje visoku topljivost isključivo u vodi. U vodenom okruženju, jedinice galaktoze, vezane na jedinice manoze, stupaju u interakciju s molekulama vode i rezultiraju međumolekulskim ispreplitanjem lanaca što pomaže u zgušnjavanju i povećanju viskoznosti otopine, čak i pri niskim koncentracijama (Sharma i sur., 2018). Upravo zbog toga, guar guma se najčešće koristi u prehrambenoj industriji kao zgušnjivač i stabilizator emulzija i to još od 1953. godine kada je počela njezina proizvodnja u SAD-u (Yoon i sur., 2008). Carlson i suradnici (1962) primijetili su da povećanje koncentracije guar gume u otopini rezultira povećanjem viskoznosti, čak i do 10 puta jer povećanje koncentracije dovodi do većih međumolekulskih interakcija i ispreplitanja što rezultira većom viskoznošću. Otopina 1 %-tne guar gume ima viskoznost u rasponu od 2000 do 3000 mPa s (Yoon i sur., 2008).

Primjena guar gume u sušenju raspršivanjem, a i ostalim tehnikama inkapsulacije, prilično je ograničena. Među rijetkima, Pieczykolan i suradnici (2019) koristili su binarnu otopinu guar gume (3 %) i maltodekstrina (37 %) za sušenje raspršivanjem antocijana iz aronije i postigli inkapsulacijsku učinkovitost od 92,98 %, što je bilo više od učinkovitosti dobivene kombinacijom maltodekstrina s arapskom gumom, inulinom i pektinom koja se kretala od 78,61 do 92,78 %. Duhan i suradnici (2021) provodili su inkapsulaciju arome ghee maslaca sušenjem raspršivanjem uz binarnu otopinu proteina sirutke (15,8 %) i guar gume (0,1 %) i postigli visoko zadržavanje δ -dodekalaktona (66,38 %) i δ -t tetradekalaktona (78,33 %). Za

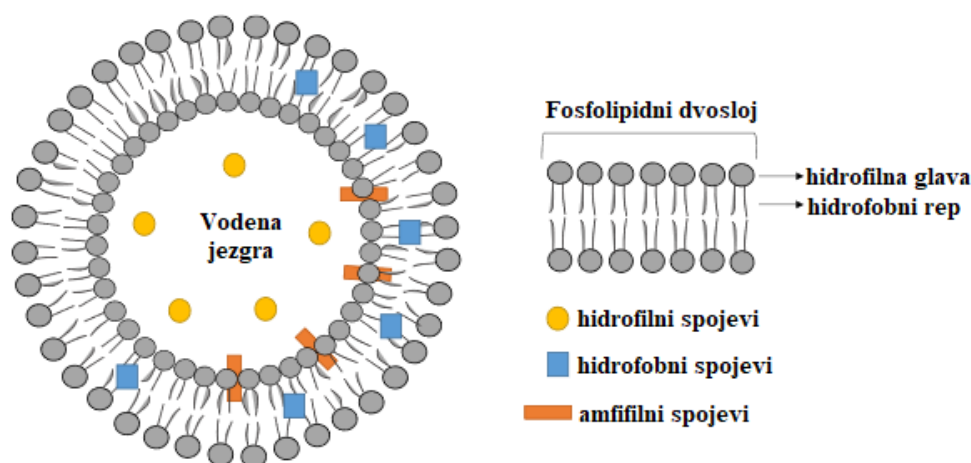
razliku od njih, Ravichandran i suradnici (2014) objavili su da sušenje raspršivanjem betalaina cikla zamjenom 2,5 i 5 % maltodekstrina u sustavu nosača s guar gumom nije bilo moguće zbog previsoke viskoznosti takve otopine. Istraživanja provedena uz primjenu guar gume kao samostalnog nosača za sušenje raspršivanjem zaista su rijetka jer pogodan nosač za inkapsulaciju tom tehnikom mora imati nisku viskoznost otopine pri njegovom visokom udjelu budući da u suprotnom može doći do začepjenja mlaznice raspršivača i nepotpunog isparavanja otapala te u konačnici niskog iskorištenja procesa (Esposito i sur., 2020). Među doista limitiranim radovima, Baena-Aristizába i suradnici (2019) koristili su guar gumu za inkapsulaciju bakterije *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* primjenom 0,4, 0,5 i 0,6 %-tnih otopina guar gume, ali dobiveni prinosi bili su izuzetno niski, u rasponu 9,3 – 31,3 %. Viši prinos, od 74 %, za sušenje raspršivanjem emulzije eteričnog ulja timijana s guar gumom, u obliku 1 %-tne otopine, određen je u radu Riberio i suradnika (2024), ali dobivena je niska inkapsulacijska učinkovitost (36,3 %). Problem visoke viskoznosti guar gume može se riješiti njezinom djelomičnom hidrolizom čime se smanjuje duljina lanca i molarna masa polimera (Mudgil i sur., 2014). U tu svrhu najčešće se provodi enzimska hidroliza koristeći enzime mananaze, celulaze, pektinaze i pululanaze, koji zahtijevaju određene specifične uvjete tijekom hidrolize, kao što su temperatura, pH, vrijeme, omjer enzima i supstrata, itd. (Mudgil, 2018; Mudgil i sur., 2012). Djelomična hidroliza guar gume može se provesti i kiselinskom hidrolizom, pri čemu se najčešće koristi klorovodična kiselina, i termalnom hidrolizom pri temperaturama 180 – 240 °C. Također, može se provoditi hidroliza zračenjem uz izotop ^{60}Co , kao i hidroliza mikrovalovima koja zahtijeva dodatak sredstva za hidrolizu ili katalizator, najčešće kalijev persulfat (Mudgil, 2018). Djelomično hidrolizirana guar guma je topivo prehrambeno vlakno koje po osnovnoj kemijskoj strukturi nalikuje nativnoj guar gumi te je koristeći djelomično hidroliziranu guar gumu moguće povećati udjel prehrambenih vlakana u raznim prehrambenim proizvodima, bez narušavanja fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava (Mudgil i sur., 2014). Piovesana i Noreña (2018) provodili su sušenje raspršivanjem polifenola čaške hibiskusa primjenom 10 %-tne otopine djelomično hidrolizirane guar gume i postigli su inkapsulacijsku učinkovitost od 60,63 %, a Kuck i Noreña (2016), koristeći isti nosač, odredili su učinkovitost inkapsulacije polifenola pokožice grožđa od 81,61 %. Sarkar i suradnici (2013) su za inkapsulaciju ulja mente sušenjem raspršivanjem dodatno modificirali djelomično hidroliziranu guar gumu s anhidridom *n*-oktenil jantarne kiseline, pri čemu su dobili inkapsulacijsku učinkovitost od 77,56 %, a modifikacijom s oleinskom kiselinom ostvarili su inkapsulacijsku učinkovitost od 72,98 %.



2.4.3. Liposomalna inkapsulacija

Područje liposomologije pokrenuli su britanski znanstvenik Alec Bangham i suradnici s Babraham instituta iz Cambridge-a sredinom 1960-ih koji su i prvi objavili strukturu liposoma (Bangham i Horne, 1964). Od tada se liposomi naširoko istražuju kao sustavi za isporuku nekih molekularnih lijekova, proteina, nukleinskih kiselina i agenasa za snimanje, a sve veću primjenu pronalaze u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Liu i sur., 2022b).

Liposomi su koloidne sferične strukture nastale samosastavljanjem amfifilnih molekula, kao što su fosfolipidi, u otopini. Liposomalna membrana može biti sastavljena od jednog ili više lipidnih dvosloja (lamela) organiziranih oko unutarnje vodene jezgre, s polarnim skupinama glave usmjerenima prema unutarnjoj i vanjskoj vodenoj fazi. Ova struktura omogućuje inkapsulaciju spojeva različite polarnosti, tako što se hidrofilne molekule inkapsuliraju u unutarnjoj vodenoj jezgri, hidrofobne u lipidnom dvosloju, a amfifilne molekule na međufazi voda/lipidni dvosloj (Slika 10) (Guimarães i sur., 2021).



Slika 10. Struktura liposoma (prema Guimarães i sur., 2021)

Glavna komponenta liposoma su amfifilni lipidi glicerofosfolipidi, sastavljeni od molekule glicerola na koju su vezane fosfatna skupina i dva lanca masnih kiselina koje mogu biti zasićene ili nezasićene. Na fosfatnu skupinu mogu biti vezane i druge organske molekule, a ovisno o tome, prirodni fosfolipidi mogu biti fosfatidna kiselina, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol, fosfatidilglicerol i fosfatidilserin. Prirodni fosfolipidi koji se najčešće koriste za formuliranje liposoma su fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin koji se nalaze u mnogim biljnim i životinjskim namirnicama, a najbogatiji su žumanjak jajeta i zrno soje. Sintetski fosfolipidi dobivaju se iz prirodnih lipida različitim modifikacijama. Upravo zbog amfifilnosti, u vodenom okruženju fosfolipidi imaju sposobnost formiranja stabilnih dvoslojeva. Liposomi

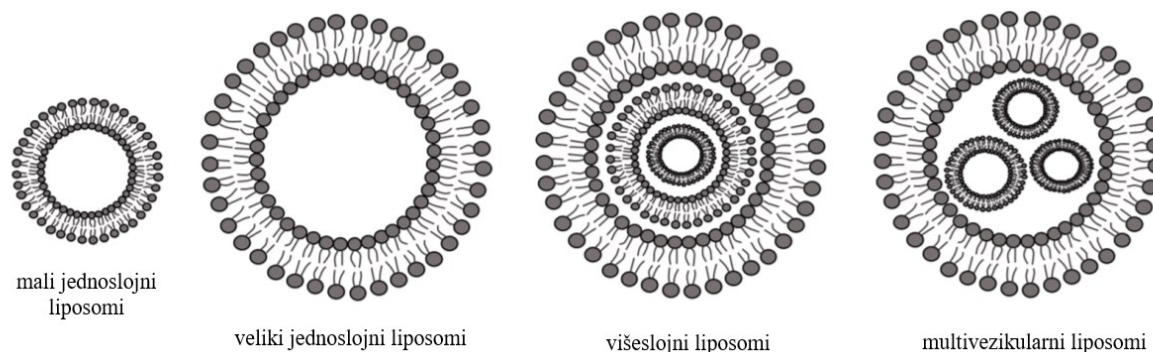


se formiraju uslijed hidrofилnih interakcija između polarnih glava, van der Waalsovih sila između lanaca ugljikovodika koje drže dugačke repove ugljikovodika zajedno i vodikovih veza s molekulama vode. Hidrofobni lanci odbijaju molekule vode i spontano dolazi do samosastavljanja liposoma u zatvoreni dvosloj. Ovisno o glavi fosfolipida, liposomi mogu imati pozitivan, negativan ili neutralan naboj i mogu postići različitu funkcionalnost varijacijama u funkcionalnim skupinama glave, alifatskim lancima i zasićenosti masnih kiselina (Liu i sur., 2019; Lombardo i sur., 2016). Stabilnost liposoma može se pospješiti primjenom fosfolipida s dužim repovima i niskim stupnjem nezasićenosti repa te eterskim vezama. Fosfolipidi s duljim zasićenim ugljikovodičnim lancima imaju veću sposobnost međusobnog djelovanja i stvaranja kruto uređenih dvoslojnih struktura. Stabilnost liposoma može se unaprijediti i ugradnjom kolesterola, glikola koji uključuju propilen glikol i polietilen glikol te nekih polimera, kao što je kitozan (Guimarães i sur., 2021).

Među tehnikama pripreme liposoma, ističu se tehnike hidratacije tankog filma, dvostrukog emulgiranja, ubrizgavanja otapala, proliposoma, itd., a vrlo često se u svrhu naknadnog smanjenja veličine formuliranih liposoma koristi ultrasonifikacija, ekstruzija, homogenizacija ili njihove kombinacije, kao npr. kombinacija ekstruzije i homogenizacije visokim tlakom, koja je vrlo često primjenjiva u farmaceutskoj industriji (Liu i sur., 2022b; Šturm i Poklar Ulrich, 2021).

Prema strukturi, liposomi se kategoriziraju prema broju lipidnih dvosloja, odnosno lamela, te na temelju veličine. Prema broju lipidnih dvosloja, liposomi mogu biti jednoslojni (svi rasponi veličina), višeslojni (> 500 nm) i multivezikularni (> 1000 nm) (Slika 11). Jednoslojni liposomi prema veličini mogu biti mali (20 – 100 nm), veliki (> 100 nm) i gigantski (> 1000 nm), a zbog prisutnosti jednog lipidnog dvosloja pogodni su za inkapsulaciju hidrofилnih spojeva. Višeslojni liposomi sastoje se od dva ili više koncentričnih lipidnih dvosloja, organiziranih u strukturu nalik luku te su pogodni za inkapsulaciju hidrofobnih spojeva. Multivezikularni liposomi uključuju nekoliko malih nekoncentričnih vezikula zarobljenih unutar jednog lipidnog dvosloja i prikladni su za inkapsulaciju velikog volumena hidrofилnog materijala (Guimarães i sur., 2021).





Slika 11. Podjela liposoma prema broju lipidnih dvosloja i veličini (prema Guimarães i sur., 2021)

Liposomalna tehnika prikladna je za inkapsulaciju različitih bioaktivnih spojeva širokog raspona polarnosti, pa tako i polifenolnih spojeva. Pregled literaturnih podataka na temu inkapsulacije polifenolnih spojeva biljnoga podrijetla liposomima, u posljednjih 5 godina, naveden je u Tablici 5.

Tablica 5. Pregled znanstvenih istraživanja vezanih uz liposomalnu inkapsulaciju polifenolnih spojeva biljnoga podrijetla u posljednjih 5 godina

Fosfolipid	Tehnika pripreme liposoma	Inkapsulirani sastojak	Inkapsulacijska učinkovitost	Referenca
Sojin lecitin (>30 % fosfatidilkolina) uz dodatak stigmasterola	Hidratacija tankog filma	Ekstrakt lišća centele	Ukupni polifenoli: 67,8 %	Tripathy i Srivastav (2023)
Dipalmitoilfosfatidilkolin, dicetil fosfat i kolesterol (7:2:1) (Mozafarijeva metoda)	Tehnika zagrijavanja	Ekstrakt ružmarina	Ukupni polifenoli: 54,6 %	Jahanfar i sur. (2023)
Fosfatidilkolin uz dodatak kolesterola	Hidratacija tankog filma	Ekstrakt bijelog čaja	Ukupni polifenoli: 76 %	Ahmadi i sur. (2022)



Tablica 5. Pregled znanstvenih istraživanja vezanih uz liposomalnu inkapsulaciju polifenolnih spojeva biljnog podrijetla u posljednjih 5 godina – nastavak

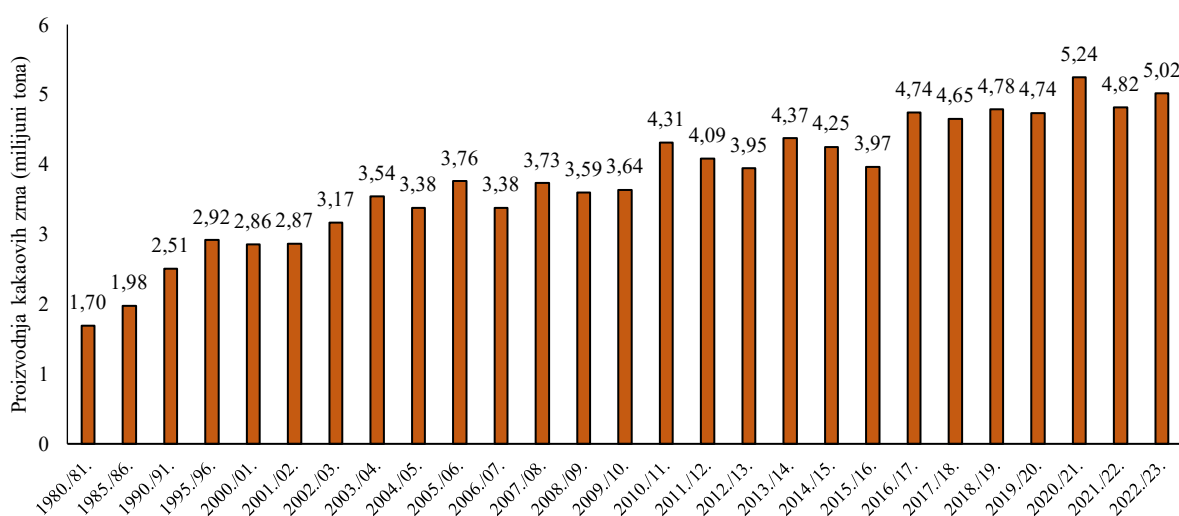
Fosfolipid	Tehnika pripreme liposoma	Inkapsulirani sastojak	Inkapsulacijska učinkovitost	Referenca
Lipoid E80 (80 % fosfatidilkolin iz žumanjka jajeta) uz dodatak kolesterola	Isparavanje reverznih faza	Ekstrakt ružmarina	Ukupni polifenoli: 52,3 %	Ielciu i sur. (2022)
Phospholipon 90 G (≥ 94 % fosfatidilkolin iz zrna soje)	Tehnika proliposoma	Ekstrakt trave ive	Ukupni polifenoli: 72,9 % Ehinakozid i verbaskozid: 68,3 i 80,6 %	Šeremet i sur. (2022)
Fosfatidilkolin i fosfatidilserin	Hidratacija lipidnog filma	Ekstrakt mišjakinje	Ukupni polifenoli: 92,1 i 84,3 %	Miere Groza i sur. (2021)
Phospholipon 90 G (≥ 94 % fosfatidilkolin iz zrna soje)	Hidratacija tankog filma	Ekstrakt lišća masline	Oleuropein i verbaskozid: 33,8 i 75,0 %	González-Ortega i sur. (2021)
Fosfatidilkolin iz žumanjka jajeta	Hidratacija filma u kombinaciji s ultrazvukom i ekstruzijom	Ekstrakt goji lišća	Ukupni polifenoli: 84,6 %	Pāvāloiu i sur. (2021)
L- α -fosfatidilkolin (>60 %)	SuperLip proces	Ekstrakt taloga kave	Ukupni polifenoli: 26 – 100 %	Pettinato i sur. (2020)
Lecitin iz žumanjka jajeta i kolesterol	Disperzija tankog filma	Proantocijanidini iz perikarpa ličija	Oligomerni proantocijanidini: 80 – 90 %	Luo i sur. (2020a)
Sojin lecitin i kolesterol	Kombinacija hidratacije tankog filma, sonikacije i liofilizacije	Ekstrakt selagine	Ukupni flavonoidi: 81,3 – 91,2 %	Chen i sur. (2019)



2.5. Kakaova zrna i proizvodnja čokolade

2.5.1. Proizvodnja kakaovih zrna

Kakaovac (*Theobroma cacao* L.) pripada porodici Malvaceae (sljezovke), a kakaova zrna, koja se nalaze unutar ploda izvor su glavnih sastojaka (kakaova masa i kakaov maslac) u proizvodnji čokolade (Qin i sur., 2016). Svjetska proizvodnja kakaovih zrna od 1980./1981., kada je iznosila 1,70 milijuna tona, do 2022./2023., s proizvodnjom od 5,02 milijuna tona, se utrostručila (Slika 12) (Statista, 2023a; Statista, 2022a).

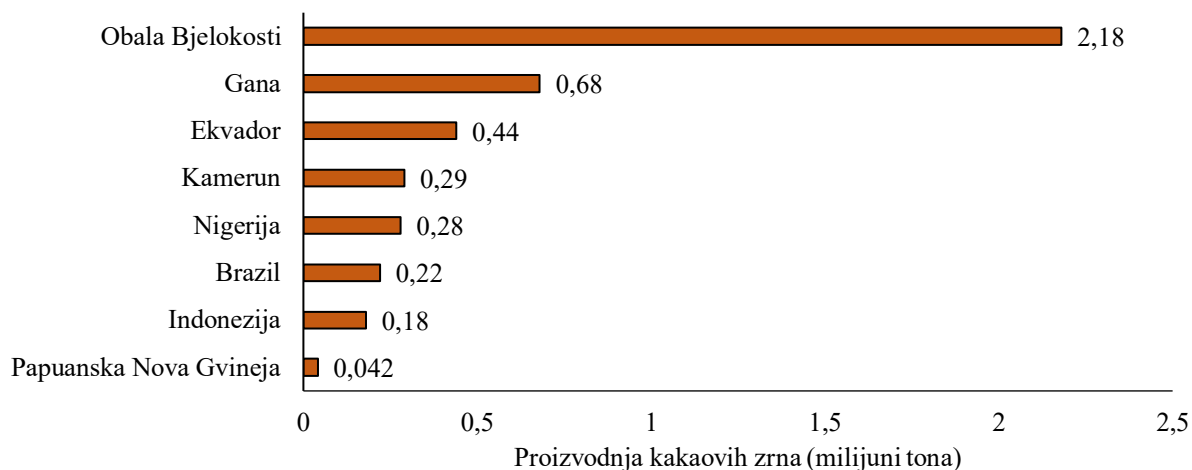


Slika 12. Proizvodnja kakaovih zrna od 1980. do 2023. godine (Statista, 2023a; Statista, 2022a)

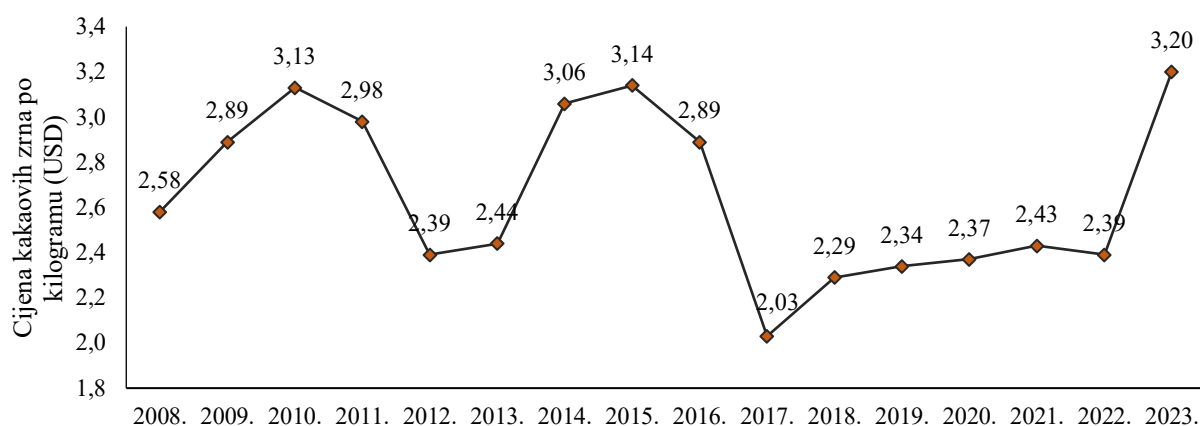
Najviše kakaovih zrna, čak oko 74 % ukupne proizvodnje, proizvodi se na području Afrike, gdje su Obala Bjelokosti i Gana najveći svjetski proizvođači. Kvalitetna kakaova zrna dolaze i iz Južne Amerike (Ekvador i Brazil), uz zastupljenost u svjetskoj proizvodnji od oko 20 %, a oko 5 % dolazi i iz Azije i Oceanije (Indonezija i Papuanska Nova Gvineja) (ICCO, 2023). Proizvodnja kakaovih zrna prema pojedinim državama za razdoblje 2022./2023. prikazana je na Slici 13.

Cijena kakaovih zrna, kao i svake druge sirovine, ovisi o ponudi i potražnji, kao i o prirodnim, geopolitičkim i infrastrukturnim uvjetima u državama u kojima se proizvodi. Promjena cijene kakaovih zrna u razdoblju od 2008. do 2023. godine prikazana je na Slici 14.





Slika 13. Države s najvećom proizvodnjom kakaovih zrna u razdoblju 2022./2023. (ICCO, 2023)



Slika 14. Promjena cijene kakaovih zrna od 2008. do 2023. godine (Statista, 2023b; Statista, 2023c)

U nadolazećem razdoblju predviđa se značajan rast cijene kakaovih zrna uslijed malog prinosa proizvodnje na području Zapadne Afrike uzrokovanog meteorološkom pojavom El Niño, kao i konstantnim klimatskim promjenama koje uzrokuju više temperature i promjene u obrascima padalina (BBC, 2024). Na dan 4. travnja 2024. godine, prema podacima Međunarodne organizacije za kakao (engl. *International Cocoa Organization* - ICCO), cijena 1 kilograma kakaovih zrna iznosila je 9,1 USD.

Postoje tri osnovna varijeteta kakaovih zrna, a to su Forastero, Criollo i Trinitario, premda pojedini autori navode Nacional kao četvrti, iako se radi o Forastero varijetetu koji se uzgaja u



Ekvadoru i čini svega 5 % svjetske proizvodnje. Forastero je podrijetlom iz Amazone, a danas se uglavnom proizvodi u zapadnoj Africi i predstavlja oko 95 % svjetske proizvodnje kakaovih zrna jer ima veći prinos od drugih varijeteta, a i otporniji je na bolesti i nametnike. U Gani se, od varijeteta Forastera, uzgajaju kultivari Amelonado (13,3 %), Amazonica (34,4 %) i hibrid (52,3 %) kojeg lokalni uzgajivači zovu Akokora Bedi, dok je u Brazilu zastupljen Comum, a Matina ili Ceylan u Kostariki i Meksiku. Criollo kakaova zrna danas su vrlo rijetka i proizvode se samo na starim plantažama u Venezueli, Srednjoj Americi, Madagaskaru, Šri Lanki i Samoi. Trinitario je hibrid varijeteta Criollo i Forastero, koji se razvio u Trinidadu, po čemu je i dobio ime. Kasnije se proizvodnja proširila na Venezuelu, Ekvador, Kamerun, Samou, Šri Lanku i Papuansku Novu Gvineju (Afoakwa, 2016). Karakteristike osnovnih varijeteta kakaovih zrna prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Karakteristike Criollo, Forastero i Trinitario varijeteta kakaovih zrna (Afoakwa, 2016)

Karakteristike	Criollo	Forastero	Trinitario	
<i>Plod</i>	Tekstura	mekana i naborana	tvrda i glatka	većinom tvrda
	Boja	crvena	zelena	promjenjiva
<i>Sjemenke</i>	Broj zrna u plodu	20 – 30	> 30	> 30
	Boja kotiledona	bijela, boja slonovače ili svijetlo ljubičasta	svijetlo do tamno ljubičasta	promjenjiva; rijetko bijela
<i>Agronomski uvjeti</i>	Otpornost stabla	niska	visoka	umjerena
	Osjetljivost na nametnike i bolesti	osjetljiv	umjereno	umjereno
<i>Kvaliteta</i>	Fermentacija	1 – 3 dana	5 dana	4 – 5 dana
	Udjel kakaovog maslaca	nizak	visok	srednji
	Veličina sjemenki (masa (g) 100 sjemenki)	85	94	91



Motamayor i suradnici (2008) predložili su drugačiju klasifikaciju kakaovih zrna, za koju i Međunarodna organizacija za kakao (ICCO) navodi da je točnija, uzimajući u obzir sličnosti i razlike u morfološkim, geografskim i genomskim svojstvima zrna, i ona uključuje 10 varijeteta: Amelonado, Criollo, Nacional, Contamana, Curaray, Guiana, Iquitos, Maraňon, Nanay i Purús. Na svjetskom tržištu uvriježena je klasifikacija na dvije kategorije kakaovih zrna: zrna „fine arome“ (engl. „*fine flavour*“) i „obična“ (engl. „*bulk*“ ili „*ordinary*“) zrna. U zrna fine arome ubrajaju se Criollo, Trinitario i Nacional, a u obična zrna Forastero, ali postoje i određene iznimke. Tako su primjerice Trinitario zrna iz Kameruna klasificirana kao obična zrna. Zrna fine arome, uz uravnotežena osnovna svojstva, karakteriziraju i jasno uočljive aromatične i okusne note. Aroma i okus rezultat su interakcija genetskog podrijetla, povoljnih uvjeta uzgoja, specifičnih tehnika upravljanja plantažama, specifičnosti berbe i obrade zrna nakon berbe te stabilnog kemijskog i fizikalnog sastava zrna (Anonymous 8). Obična zrna čine oko 80 % svjetske proizvodnje, ali sve više raste potražnja za zrnima fine arome čiji je najveći proizvođač Peru (75 %). Dvije tradicionalne sorte u Peruu čija zrna su finog okusa su Chunchu iz južnog Perua i Piura Porcelana koja se uglavnom uzgaja u sjevernom dijelu Perua (Bustamante i sur., 2022).

2.5.2. Izazovi u dostatnoj proizvodnji kakaovih zrna

Procijenjeno je da bolesti i nametnici uzrokuju uništenje oko 30 % svjetskog uroda kakaovca godišnje (Naik i Kumar, 2014). Najučestalije bolesti su bolest crnog ploda, čiji je uzročnik biljni patogen *Phytophthora megakarya*, zatim bolest vještičja metla, koju uzrokuje gljiva *Moniliophthora perniciosa*, te virusna bolest natečenih izdanaka kakaovca, a najzastupljeniji nametnici su kukci *Distantiella theobroma* i *Sahlbergella singularis* (Afoakwa, 2016). Klimatske promjene također negativno utječu na razvoj i urod kakaovca mijenjajući okolišne uvjete u kojima se uzgaja. Kakaovcu su za razvoj potrebni vlažni uvjeti s oko 1200 – 1500 mm oborina godišnje i s ograničenim brojem suhih dana (< 90 dana) te temperaturama u rasponu 25 – 32 °C (Yoroba i sur., 2019). Iako zagrijavanje izazvano klimatskim promjenama nije ravnomjerno po cijeloj planeti, trend rasta globalne prosječne temperature pokazuje da se veći dio područja zagrijava nego što se hladi. Temperatura planete rasla je u prosjeku za 0,06 °C po desetljeću od 1850. do 2023. godine, a stopa zagrijavanja od 1982. godine iznosila je 0,20 °C po desetljeću. Godina 2023. bila je najtoplija od početka globalnih mjerenja koja su počela 1850. godine i bila je 1,18 °C iznad prosjeka temperature 20. stoljeća (13,9 °C) (NOAA Climate, 2024). Globalni klimatski modeli predviđaju kontinuirano povećanje temperatura i



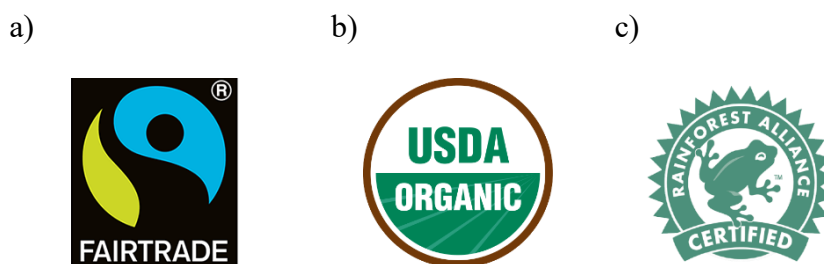
promjene u obrascima padalina što će značajno utjecati na smanjenje uroda kakaovca na postojećim plantažama. Također je predviđeno da će prikladna područja za uzgoj kakaovca biti ona u blizini šumskih rezervata gdje će oborine najvjerojatnije ostati dovoljno visoke. Krčenje šuma pogoršat će učinke klimatskih promjena rezultirajući lokalno smanjenom količinom oborina, dodatnim emisijama uzrokovanim promjenom namjene zemljišta i smanjenjem prepreka širenju nametnika i bolesti (Bunn i sur., 2018).

Pritisak na povećanje proizvodnje kakaovih zrna u svrhu zadovoljavanja rastuće svjetske potražnje ima negativan utjecaj na okoliš, gospodarstvo i društvo zemalja u kojima se ona proizvode te se stoga javila potreba za uspostavljanjem održive proizvodnje visokokvalitetnih kakaovih zrna. Međutim, sljedivost proizvodnje kakaovih zrna i čokolade je izazovna budući da je opskrbeni lanac kompleksan i uključuje brojne dionike, a višestruki koraci (proizvodnja sirovina, obrada i distribucija konačnog proizvoda) često su raspoređeni u različitim regijama. Veliki problem u sljedivosti predstavljaju loši sustavi upravljanja u većini regija u kojima se proizvode kakaova zrna. Iako su uvedeni programi obuke za poljoprivrednike, primjena dobrih poljoprivrednih praksi još uvijek je nedostatna, a jedan od glavnih problema je nedostupnost visokokvalitetnog sadnog materijala za male poljoprivrednike što rezultira lošom kvalitetom plodova kakaovca i niskim profitom. Strategija za unaprjeđenje gospodarskih uvjeta uzgajivača kakaovca uključuje certifikacijske sheme čiji je cilj poboljšati uvjete rada i povećanje profita uzgajivača, što bi se pozitivno odrazilo i na lokalnu zajednicu i okoliš. Najava da će europska tržišta od 2020. godine kupovati samo certificirana kakaova zrna potaknula je razvoj ove tržišne niše i motivirala izvoznike da certificiraju svoje proizvođače. Ipak, promjene su spore i potrebno je više poticaja za prijelaz prema uvođenju certifikacijskih shema. Premda će certificiranje utjecati na povećanje cijena čokolada, smatra se da bi se ipak smanjenje prodaje moglo izbjeći dobro organiziranim marketingom i informiranjem potrošača o održivosti (Perez i sur., 2022).

Među najpoznatijim certifikatima za čokoladu su „Fair Trade“, „USDA Organic“ i „Rainforest Alliance“. „Fair Trade“ certifikat (Slika 15a) na čokoladi trebao bi biti svojevrsna potvrda da poljoprivrednici i radnici rade u sigurnim i humanim uvjetima uz primanje odgovarajuće naknade za rad, kao i da su kakaova zrna proizvedena na ekološki prihvatljiv način. Certifikat „USDA Organic“ (Slika 15b) nalazi se na čokoladi koja je proizvedena od kakaovih zrna uzgojenih bez upotrebe sintetskih pesticida i gnojiva. Čokolada s certifikatom „Rainforest Alliance“ (Slika 15c) proizvodi se od kakaovih zrna s farmi koje zadovoljavaju stroge ekološke i društvene standarde što uključuje zaštitu šuma i divljih životinja te očuvanje prirodnih resursa,



odnosno, označava da je proizvod dobiven korištenjem metoda koje poštuju tri stupa održivosti: društveni, ekonomski i ekološki (Anonymous 9).



Slika 15. Certifikati čokolada

Postizanje održivog svjetskog gospodarstva kakaovih zrna, odnosno postizanje održive proizvodnje, industrijskog lanca, potrošnje i strateškog upravljanja sektorom kakaovih zrna, jedan je od ciljeva Međunarodne organizacije za kakao (engl. *International Cocoa Organization* - ICCO). ICCO je međuvladina organizacija osnovana 1973. godine pod pokroviteljstvom Ujedinjenih naroda koja djeluje u okviru međunarodnih sporazuma o kakau. Organizacija se sastoji od 51 zemlje članice, od kojih su 22 zemlje izvoznice kakaovih zrna, a 29 su zemlje uvoznice. Ove zemlje članice zajedno predstavljaju 86 % svjetskog izvoza i 72 % svjetskog uvoza kakaovih zrna (Anonymous 10). Unaprjeđenje kvalitete života poljoprivrednika i zajednica koji uzgajaju kakaova zrna, borba protiv dječjeg rada i sprečavanje deforestacije šuma, misije su Svjetske zaklade za kakao (engl. *World Cocoa Foundation* – WCF). WCF je međunarodna organizacija čiji su članovi poljoprivredne zadruge, uzgajivači i trgovci kakaovih zrna, proizvođači čokolada te tvrtke u opskrbnom lancu. Članice WCF-a su i neke poznate svjetske tvrtke, poput Barry Callebaut, Ferrero, Lindt & Sprüngli, Nestle, Starbucks, itd. (Anonymous 11).

Napreduju i istraživanja u uzgoju transgenih biljaka kakaovca otpornih na bolesti i nametnike, a *in vitro* embriogeneza pokazala se kao uspješna alternativa tradicionalnim metodama razmnožavanja kakaovca jer omogućuje brzo klonsko razmnožavanje (Wickramasuriya i Dunwell, 2018). Također, zbog nesigurne dostupnosti kakaovog maslaca, a i njegove visoke cijene, prehrambena industrija istražuje alternative kakaovom maslacu. Alternative kakaovom maslacu definiraju se kao ulja/masti koje u potpunosti ili djelomično mogu zamijeniti kakaov maslac u konačnom proizvodu. U tu svrhu, koriste se prirodna jestiva ulja/masti, njihove mješavine ili se provode modifikacije (interesterifikacija, hidrogenacija i frakcioniranje) ukoliko njihov sastav triglicerida nije zadovoljavajući za inkorporaciju u čokoladne proizvode.



Alternative kakaovom maslacu se, ovisno o fizikalnim i kemijskim svojstvima te o sposobnosti miješanja s kakaovim maslacem, dijele na ekvivalente, zamjene i djelomične zamjene kakaovog maslaca. Ekvivalenti kakaovog maslaca su biljne masti/ulja (npr. shea maslac, illipe maslac, sal, ulje koštice manga, kokum gurgi, ulje mezokarpa ploda palme) koje imaju sličan sastav triglicerida kao kakaov maslac te stoga i slična fizikalna, kemijska i senzorska svojstva i mogu se miješati s njim u različitim omjerima bez promjene reoloških i procesnih svojstava konačnog proizvoda. Zamjene kakaovog maslaca proizvode se od masti/ulja bogatih laurinskom kiselinom kao što su rafinirano i deodorizirano ulje palminih koštica ili kokosovo ulje, a uz laurinsku kiselinu, sadrže i miristinску kiselinu te omogućuju potpunu zamjenu kakaovog maslaca. Djelomične zamjene kakaovog maslaca su ulja/masti koje se mogu miješati s kakaovim maslacem u ograničenim količinama bez promjene reoloških svojstava i procesnih svojstava, a uključuju ne-laurinske masti, poput repičinog i sojinog ulja te ulja sjemenki pamuka, i čija proizvodnja uključuje djelomičnu hidrogenaciju biljnih ulja što rezultira nastankom *trans* masnih kiselina (Norazlina i sur., 2021; Naik i Kumar, 2014). Prema Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima (NN 73/2005), količina dodanih biljnih masnoća ne smije prijeći 5 % gotovog čokoladnog proizvoda, a biljne masnoće koje se dodaju pojedinačno ili u smjesi kao zamjena kakaovom maslacu moraju biti nelaurinske biljne masnoće, bogate simetričnim mononezasićenim trigliceridima poput 2-oleopalmitostearata, 2-oleodistearata i 2-oleodipalmitata. Također, moraju se miješati u bilo kojem omjeru s kakaovim maslacem i svojstva im moraju biti sukladna s njegovim fizikalnim svojstvima te moraju biti dobivene isključivo procesom rafinacije i/ili frakcioniranja koji isključuje enzimsku modifikaciju strukture triglicerida. Prema tome, u tu svrhu, smiju se koristiti illipe maslac, palmino ulje, sal, shea maslac, kokum gurgi i ulje koštice manga. Kao alternative, istražuju se i oleogelovi koji u čokoladama omogućuju smanjeni udjel zasićenih masnih kiselina, a veći udjel nezasićenih, a također i odsustvo *trans* masnih kiselina. Oleogelovi koriste jedan ili više gelova za vezanje tekućeg ulja u trodimenzionalnu mrežu kako bi se biljno ulje promijenilo u krutu ili polukrutu mast (Sun i sur., 2021).

Unatoč brojnim izazovima u proizvodnji dostatne količine kakaovih zrna, potražnja za njima raste, kako u prehrambenoj industriji, tako i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji gdje naročito postoji interes za kakaovim maslacem. Europa ima najveću industrijsku potražnju za kakaovim zrnima te predstavlja najveće tržište s čak 56 % svjetskog uvoza kakaovih zrna. U Europi su najveći svjetski proizvođači čokolade među kojima dominiraju multinacionalne tvrtke Nestlé, Mondelez, Mars, Hershey, Lindt & Sprüngli i Ferrero. Europsko tržište kakaovih



zrna je raznoliko jer europski kupci nabavljaju zrna različite kvalitete i podrijetla kako bi zadovoljili veliku potražnju, prvenstveno konditorske industrije (CBI, 2022).

2.5.3. Čokolada kao funkcionalna hrana

Pojam „funkcionalna hrana“ pojavio se u Japanu 80-ih godina prošlog stoljeća, međutim, danas u mnogim zemljama još uvijek ne postoje zakonski okviri unutar kojih bi se ovaj pojam jasno definirao (Granato i sur., 2020). Funkcionalna hrana definira se kao hrana koja pruža dodatnu zdravstvenu dobrobit iznad osnovne prehrambene vrijednosti hrane (Khan i sur., 2013), a prema Granato i suradnicima (2017), funkcionalna hrana može se definirati kao industrijski prerađena ili prirodna hrana koja, ako se konzumira redovito kao dio raznovrsne prehrane, ima potencijalno pozitivne učinke na zdravlje izvan osnovne prehrane. Ova definicija sužava široku upotrebu izraza „funkcionalno“ tako da se bez odgovarajućeg kliničkog ispitivanja i značajnih eksperimentalnih dokaza sigurnosti i funkcionalnosti nijedna svježa, neprerađena ili prerađena hrana ne može smatrati funkcionalnom. Prije izdavanja zdravstvenih tvrdnji za određenu hranu, potrebna su nasumična, dvostruko slijepa te placebo kontrolirana klinička ispitivanja kako bi se utvrdila funkcionalna učinkovitost (Granato i sur., 2020).

Funkcionalna hrana uključuje 4 kategorije proizvoda: i) „pojačani proizvodi“ (engl. *fortified products*) su proizvodi u koje je dodan dodatni nutrijent; ii) obogaćeni proizvodi (engl. *enriched products*) su proizvodi u koje je dodan sastojak koji se normalno ne nalazi u njegovom sastavu; iii) izmijenjeni proizvodi (engl. *altered products*) su proizvodi iz kojih je nepoželjni sastojak uklonjen, smanjen ili zamijenjen drugim sastojkom s pozitivnim djelovanjem; i iv) modificirani proizvodi (engl. *enhanced commodities*) su proizvodi u kojima je udjel neke tvari prirodno povećan primjenom posebnih uvjeta uzgoja, sastava hrane, genetskom manipulacijom ili drugim postupcima (Siró i sur., 2008). Tržište funkcionalne hrane raste iz godine u godinu što pokazuju i statistički podaci. Svjetsko tržište funkcionalne hrane 2019. godine imalo je vrijednost od 178 milijarde USD, a za 2024. godinu procjenjuje se vrijednost od 230 milijardi USD, dok je procijenjena vrijednost za 2027. godinu čak 268 milijardi USD (Statista, 2021a). Glavni motivi potrošača za kupnju funkcionalne hrane su prevencija kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, Alzheimerova bolest i osteoporoza, održavanje zdravlja, povećanje energije, jačanje imunološkog sustava, itd. (Khan i sur., 2013).

Kakaovi proizvodi vrlo su popularni zbog svojih senzorskih karakteristika, a u novije vrijeme povećanoj konzumaciji doprinose i rezultati istraživanja o potencijalno pozitivnim zdravstvenim učincima. U prilog tome svakako ide i naziv kakaovca. Naime, švedski



znanstvenik Carl Linné 1753. godine nazvao je kakaovac *Theobroma cacao* što se prevodi kao hrana bogova (Lippi, 2015). Konzumacija kakaovih proizvoda aktivira centre za zadovoljstvo ljudskog mozga i ima uglavnom stimulativno, opuštajuće i antidepresivno djelovanje zbog prisutnosti metilksantina - teobromina i kafeina, što rezultira jedinstvenim psihofarmakološkim svojstvima (Tuenter i sur., 2018). Zanimljivo je istaknuti da kakaovo zrno, a i čokolada u manjem udjelu, sadrže dva neurotransmitera važna za mozak – anandamid (N-arahidonoil etanolamin) koji je kanabinoid i poznat po tome što „popravlja“ raspoloženje i stimulira dijelove mozga povezane s motivacijom, te feniletilamin, koji aktivira dijelove mozga povezane s koncentracijom, percepcijom i užitkom (Rodrigues-Silva, 2012). Kakaovo zrno i čokolada s visokim udjelom kakaovih dijelova sadrže visoki udjel magnezija (Cinquanta i sur., 2016) koji je kofaktor u više od 300 enzimskih sustava koji reguliraju različite biokemijske reakcije u tijelu, uključujući sintezu proteina, funkciju mišića i živaca, kontrolu glukoze u krvi i regulaciju krvnog tlaka (Grassia i sur., 2019). Od polifenolnih spojeva u čokoladi, najznačajniji su flavan-3-oli, antocijani i proantocijanidini odgovorni za brojne zdravstvene dobrobiti povezane s konzumacijom čokoladnih proizvoda. Smatra se da upravo oni pridonose kardiometaboličkim zdravstvenim dobrobitima modulacijom krvnog tlaka i profila lipida (Tan i sur., 2021). Prema Uredbi Komisije 2015/539 odobrena je zdravstvena tvrdnja za flavanole iz kakaa koja navodi da njihov dnevni unos od 200 mg pomaže u očuvanju elastičnosti krvnih žila što pridonosi normalnom protoku krvi. Nekoliko meta-analiza pokazalo je prednosti konzumacije čokolade u smanjenju rizika od kardiometaboličkih oboljenja uključujući koronarnu bolest srca, infarkt miokarda, moždani udar i dijabetes (Yuan i sur., 2017; Larsson i sur., 2016). U istraživanju Lee i suradnika (2003), napitak pripremljen od kakaovog praha sadržavao je više ukupnih polifenola po serviranju (611 mg EGK) u usporedbi sa serviranjem crnog čaja (124 mg EGK), zelenog čaja (165 mg EGK) i crnog vina (340 mg EGK). Kakaovi i čokoladni proizvodi s visokim udjelom kakaovih dijelova, uslijed brojnih pozitivnih utjecaja na zdravlje (Tablica 7), smatraju se funkcionalnom hranom. Osim toga, pošto je čokolada omiljeni proizvod svih generacija potrošača, pokazala se kao dobar matriks za isporuku različitih bioaktivnih spojeva i funkcionalnih sastojaka potrošačima, a primjeri su prikazani u Tablici 8. Neke od čokolada obogaćenih različitim funkcionalnim sastojcima dostupne na tržištu prikazane su na Slici 16.



Tablica 7. Pregled istraživanja o utjecaju kakaovih i čokoladnih proizvoda na zdravlje

	Ispitanici / biološki test sustavi	Ispitivani kakaov proizvod i količina	Vrijeme eksperimenta	Zaključak	Referenca
Kardiovaskularni sustav	Odrasli zdravi ljudi prosjeka godina $19,9 \pm 1,7$ (n=30)	Čokolada s 90 % kakaovih dijelova (20 g dnevno)	30 dana	Konzumacija čokolade pokazala je pozitivne učinke na kardiovaskularni sustav ispitanika poboljšavajući vaskularnu funkciju smanjenjem tlaka u brahijalnoj arteriji i potičući vaskularnu relaksaciju, a time i bolje usklađivanje rada arterijskog sustava s lijevom klijetkom.	Vlachopoulos i sur. (2005)
	Mlade žene u rasponu godina 19 – 28 (n=47)	Čokolada s 85 % kakaovih dijelova i mliječna čokolada s 30 % kakaovih dijelova (1 g kg^{-1} tjelesne mase)	Jednokratan unos	Jednokratan unos čokolade s 85 % kakaovih dijelova povećao je relativne vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka i dvostrukog produkta u mirovanju, ali je ublažio reaktivnost dijastoličkog krvnog tlaka, otkucaja srca, srednjeg arterijskog krvnog tlaka i dvostrukog produkta tijekom mentalnog stresa, što nije utvrđeno za mliječnu čokoladu.	Regecova i sur. (2019)
	Zdravi ronionci (n=20)	Čokolada s 86 % kakaovih dijelova (30 g)	Jednokratan unos	Konzumacija čokolade 1 sat prije ronjenja povećala je dilataciju posredovanu protokom i spriječila endotelnu disfunkciju, koja se primjećuje nakon niza ronjenja na dah, i neutralizirala slobodne radikale koji nastaju tijekom ronjenja na dah.	Theunissen i sur. (2013)
Imunološki sustav	Odrasli zdravi ljudi prosjeka godina $39,2 \pm 8,6$ (n=123)	Napitak pripremljen od kakaovog praha (18 g, 1 napitak dnevno)	6 tjedana	Skupina ispitanika koja je konzumirala kakaov napitak tri tjedna prije i tri tjedna nakon injekcije viruse gripe (A(H1N1)pdm2009), imala je povećanu aktivnost NK stanica (stanice ubojice) te snažniju zaštitu od virusa.	Kamei i sur. (2016)
Probavni sustav	Odrasli zdravi ljudi u rasponu godina 20 – 30 (n=48)	Čokolada s 70 i 85 % kakaovih dijelova (10 g 3 puta dnevno)	3 tjedna	Čokolada je pokazala prebiotičko djelovanje kod zdravih odraslih osoba kroz sposobnost restrukturiranja raznolikosti i količine crijevnih bakterija što je povezano i s promjenama raspoloženja.	Shin i sur. (2022)



Tablica 7. Pregled istraživanja o utjecaju kakaovih i čokoladnih proizvoda na zdravlje – nastavak

	Ispitanici / biološki test sustavi	Ispitivani kakaov proizvod i količina	Vrijeme eksperimenta	Zaključak	Referenca
Kognitivne sposobnosti	Žene u postmenopauzi u rasponu godina 50 – 64 (n=140)	Čokolada s 99 % kakaovih dijelova (10 g dnevno)	6 mjeseci	Konzumacija čokolade uz uobičajenu prehranu rezultirala je blagim poboljšanjem kognitivnih sposobnosti u pogledu kognitivne fleksibilnosti i brzine obrade informacija kod žena u postmenopauzi.	Garcia-Yu i sur. (2022)
	<i>In vivo</i> modeli (Sprague Dawley štakori; n=32)	Čokolada s 70 % kakaovih dijelova (500 mg kg ⁻¹ dnevno)	3 mjeseca	Tretman starih štakora čokoladom rezultirao je smanjenjem hiperglikemije, inhibicijom aktivnosti kolinesteraze u homogenatima tkiva hipokampusa i poboljšanjem kognitivne izvedbe u zadatku Barnes-ovog labirinta povezanog s prostornom memorijom. Histološke studije otkrile su povećanje volumena stanica u CA3 regiji hipokampusa.	Madhavadas i sur. (2015)
Koštani sustav	<i>In vivo</i> modeli (Sprague Dawley štakori s ovarietomijom; n=40)	Kakaov prah (6 i 12 % udjela standardne prehrane)	95 dana	Kakaov prah poboljšao je gustoću kostiju, kvalitetu i snagu lumbalnih kralježaka kod štakora s ovariektomijom. Uz pravilno doziranje, zajedno s odgovarajućim unosom kalcija, kakaov prah pokazao je učinkovita anti-osteoporotična svojstva.	Sarmadi i sur. (2020)
Pretilost	Pretili dječaci u adolescenciji prosječna godina 15,4 ± 1,1 i indeksa tjelesne mase 32,2 ± 2,4 kg m ⁻² (n=123)	Čokolada s 83 % kakaovih dijelova (30 g dnevno)	6 tjedana	Konzumacija čokolade u kombinaciji s vježbanjem (preskakanje preko užeta) djelovalo je pozitivno na smanjenje tjelesne mase, smanjenje koncentracije proupalnih citokina (hs-CRP, TNF-α i IL-6), adipokina (leptin, rezistin, RBP-4, chemerin i MCP-1) i povećanje koncentracije protuupalnih adipokina (irisin i adiponektin) u krvi pretilih adolescentnih dječaka.	Eskandari i sur. (2020)



Tablica 8. Primjeri čokolada obogaćenih funkcionalnim sastojcima

Vrsta čokolade i udjel kakaovih dijelova	Vrsta i udjel dodanog funkcionalnog sastojka	Zaključak	Referenca
Čokolada s 58 % kakaovih dijelova	Izolat proteina sirutke (16, 20 i 24 %)	Dodatak proteina sirutke poboljšao je mehanička svojstva čokolada i njihovu otpornost na taljenje. Primjena proteina u kombinaciji s eritritolom inhibirala je pojavu cvjetanja masti.	Nastaj i sur. (2022)
Čokolada s minimalno 56 % kakaovog praha	Eterično ulje santoline (0,01, 0,02 i 0,03 mL na g čokolade)	Dodatak eteričnog ulja povećao je antioksidacijski kapacitet čokolade, nije utjecao na reološka svojstva i rezultirao je senzorski prihvatljivim čokoladama.	Bölek i sur. (2022)
Bijela čokolada	Prah Matcha čaja i konjske rotkvice (1, 2, 3 i 4 %)	Dodatak Matcha čaja i konjske rotkvice u bijelu čokoladu rezultirao je povećanjem udjela ukupnih polifenola i karotenoida te antioksidacijskog kapaciteta, uz visoku senzorsku prihvatljivost.	Poliński i sur. (2022)
Čokolada s 36,8 % kakaovih dijelova	Vitamin D3 u slobodnom i liposomalnom obliku (5 µg na 10 g čokolade)	Dodatak vitamina D3 nije utjecao na senzorska i reološka svojstva čokolade, kao ni na svojstva taljenja.	Didar (2021)
Mliječna čokolada s 37,5 % kakaovih dijelova	Ekstrakt borovnice i maline (1, 2 i 3 %), kalcijev laktat (0,5, 1 i 1,5 %) i proteini piletine (10, 20 i 30 %)	Čokolade su uspješno obogaćene kalcijem i proteinima, a dodatak voćnih ekstrakata omogućio je veću mikrobiološku stabilnost i stabilnost bioaktivnih svojstava čokolada tijekom skladištenja.	Kaur i sur. (2021)
Čokolada s 45 % kakaovih dijelova	Ekstrakti bobica i cvjetova bazge i aronije (5 %)	Dodatak ekstrakata omogućio je formulaciju čokolada izraženog antioksidacijskog kapaciteta i visokog udjela polifenolnih spojeva s malim povećanjem u udjelu vode i viskoznosti.	Poliński i sur. (2021)



Tablica 8. Primjeri čokolada obogaćenih funkcionalnim sastojcima - nastavak

Vrsta čokolade i udjel kakaovih dijelova	Vrsta i udjel dodanog funkcionalnog sastojka	Zaključak	Referenca
Čokolada s 53 i 98 % kakaovih dijelova i mliječna čokolada s 40 % kakaovih dijelova	Ekstrakti borovnice, maline, kupine, komine nara i cikle (1 %)	Dodatak ekstrakata rezultirao je povećanjem udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta i obogatio senzorski profil čokolada.	Żyżelewicz i sur. (2021)
Mliječna čokolada	Mikročestice s uljem chia sjemenki (5, 10 i 15 %)	Dodatak mikročestica nije uzrokovao značajne promjene u senzorskim, reološkim i teksturalnim svojstvima čokolade.	Razavizadeh i Tabrizi (2021)
Bijela čokolada	Ekstrakt cimeta u obliku nanočestica pripremljenih metodom precipitacije antiotapalom koristeći šelak i ksantan gumu kao nosače (2 %)	Dodatak nanočestica rezultirao je obogaćivanjem čokolada polifenolnim spojevima i povećanjem antioksidacijskog kapaciteta.	Muhammad i sur. (2021)
Bijela čokolada	Ekstrakt zelenog čaja (60, 80 i 100 g na kg čokolade)	Dodatak ekstrakta čaja doprinio je povećanju udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta čokolade uz primijećene razlike u mirisu, okusu i vizualnom izgledu.	Lončarević i sur. (2019)
Čokolada s 64, 72 i 85 % kakaovih dijelova	Inkapsulat fitosterola sušenog raspršivanjem (5, 10 i 15 %)	Dodatak inkapsulata u svim udjelima rezultirao je povećanjem antioksidacijskog kapaciteta čokolade, dok su čokolade s udjelom inkapsulata od 5 % bile senzorski bolje prihvaćene od onih pripremljenih s višim udjelom inkapsulata.	Tolve i sur. (2018)





Čokolada (min. 55 % kakaovih dijelova) s dodatkom polifenola sjemenki grožđa (0,3 %), Hedona d.o.o. (Hrvatska)



Mliječna čokolada s dodatkom kolagena Peptan® (13 %), Max Sport (Slovačka)



Čokolada (60 % kakaovih dijelova) s dodatkom Pharma Gaba® i L-teanina, The Functional Chocolate Company (SAD)



Čokolada s ekstraktom lavlje grive (1,6 %) i astragalusa (0,8 %), Joya (SAD)



Čokolada (73 % kakaovih dijelova) s kanabidiolom (1,4 %), Mac's Topicals (SAD)



Čokolada s dodatkom vitamina A (8,75 %), C (1,88 %) i D (100 iu g⁻¹), kalcija (2,88 %) i cinka (0,75 %), FourX Better Chocolate (Kanada)



Čokolada (55 % kakaovih dijelova) s dodatkom ekstrakta zelenog čaja (2 %), Amul (Indija)



Čokolada s dodatkom 5-hidroksitriptofana (2,2 %) i melatonina (0,1 %), Fx Chocolate (SAD)



Mliječna čokolada s dodatkom vitamina D3 (1000 IU g⁻¹), omega-3 (2,4 %), omega-6 (1,7 %) i omega-9 (6,2 %) masnih kiselina, Herbo Superfood (UK)



Čokolada s dodatkom omega-3 masnih kiselina iz mikroalgi (3,25 %), Ecoltr (Danska)



Čokolada (60 % kakaovih dijelova) s dodatkom cvjetova lavande (1,2 %), Delfin (Belgija)



Mliječna čokolada (55 % kakaovih dijelova) s dodatkom gljive reishi (5 %), Conchobar (Irska)

Slika 16. Zanimljivi primjeri tržišta čokolada obogaćenih funkcionalnim sastojcima



Naročito napreduju istraživanja vezana uz inkorporaciju polifenolnih spojeva u čokolade zbog sve većih zahtjeva potrošača koji su svjesni i informirani o pozitivnom utjecaju polifenola na zdravlje (Coherent Market Insights, 2022). Najsnažniji trend na današnjem tržištu je želja potrošača za hranom i sastojcima koji su "prirodno funkcionalni" te je razvoj hrane i pića biljnog porijekla u stalnom porastu (Santos-Buelga i sur., 2019). Globalno tržište polifenola 2021. godine imalo je vrijednost od 937,15 milijuna USD i procijenjen je rast po složenoj godišnjoj stopi rasta od 8,72 % za razdoblje od 2022. do 2030. godine (Coherent Market Insights, 2022).

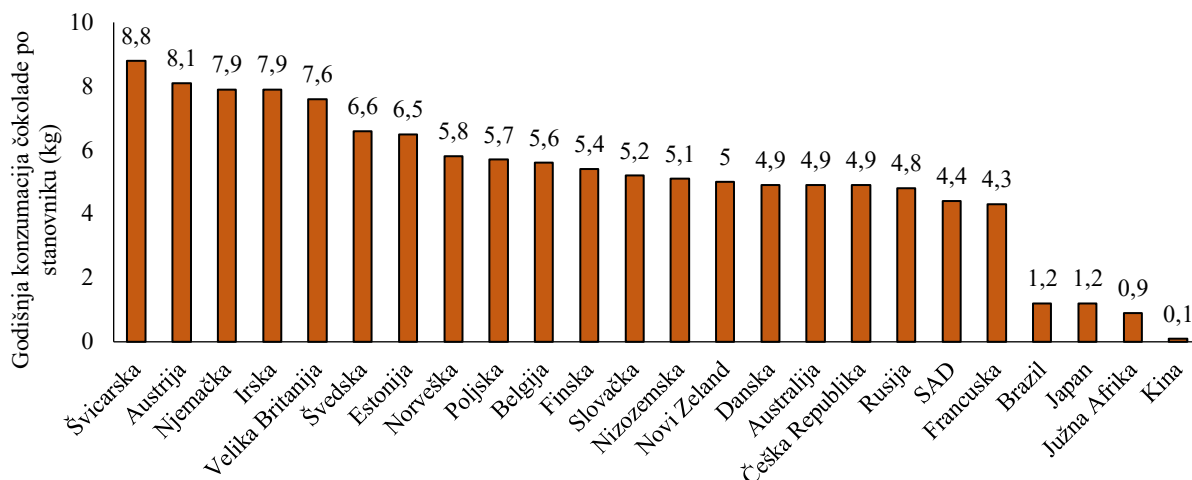
2.5.4. *Proizvodnja čokolade – formiranje arome i stabilnost polifenola*

Čokolada predstavlja polučvrstu suspenziju finih čvrstih čestica šećera, bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova i mlijeka (ovisno o vrsti) u kontinuiranoj masnoj fazi kakaovog maslaca koja se tali na tjelesnoj temperaturi i stvara glatku suspenziju (Ostrowska-Ligęza i sur., 2019; Afoakwa, 2016). U znanstvenoj literaturi, čokolade se najčešće dijele na tamnu, mliječnu i bijelu, pri čemu mliječna čokolada, uz osnovne sastojke, sadrži mliječne sirovine, a bijela ne sadrži bezmasnu suhu tvar kakaovih dijelova, već samo kakaov maslac od kakaovih dijelova (Afoakwa, 2016). Međutim, u Republici Hrvatskoj, prema Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima (NN 73/2005), razlikuju se čokolada, mliječna čokolada, obiteljska mliječna čokolada, bijela čokolada, punjena čokolada, čokolada »a la taza«, obiteljska čokolada »a la taza« i čokoladni desert ili praliné. Tržište čokoladnih proizvoda u stalnom je porastu te je 2021. godine ostvarilo prihod od približno 0,99 trilijuna USD na globalnoj razini, a predviđen je i rast u nadolazećim godinama te vrijednost od 1,33 trilijuna USD u 2027. godini (Statista, 2022b). Najviše čokolade po stanovniku godišnje (8,8 kg) konzumira se u Švicarskoj, potom u Austriji (8,1 kg), Njemačkoj i Irskoj (7,9 kg) te Velikoj Britaniji (7,6 kg), a najmanje čokolade se konzumira u Kini (0,1 kg) (Slika 17) (Statista, 2021b). U Hrvatskoj se konzumira tek 2,2 kg čokolade po stanovniku godišnje (GAIN, 2016).

Nakon berbe ploda kakaovca, kakaova zrna prolaze kroz različite procese (Slika 18), počevši od fermentacije i sušenja, koji se provode u zemlji podrijetla gdje su ustaljeni tradicionalni i lokalni procesi uzgoja i prerade, nakon čega slijedi prženje i mljevenje. Na kemijski i bioaktivni sastav kakaovih zrna utječu agronomski i klimatski uvjeti tijekom uzgoja, a kasnije i svaki postupak u preradi, pri čemu nastaje i do stotinu novih spojeva kroz različite reakcije koji utječu na okus, boju, rok trajanja, bioraspoloživost i nutritivnu vrijednost zrna (Perez i sur., 2022; Afoakwa, 2016). Sirova kakaova zrna sadrže i do 15 % polifenolnih spojeva od kojih je najzastupljeniji (-)-epikatehin koji čini i do 35 % ukupnih polifenola, ali njihov udjel u

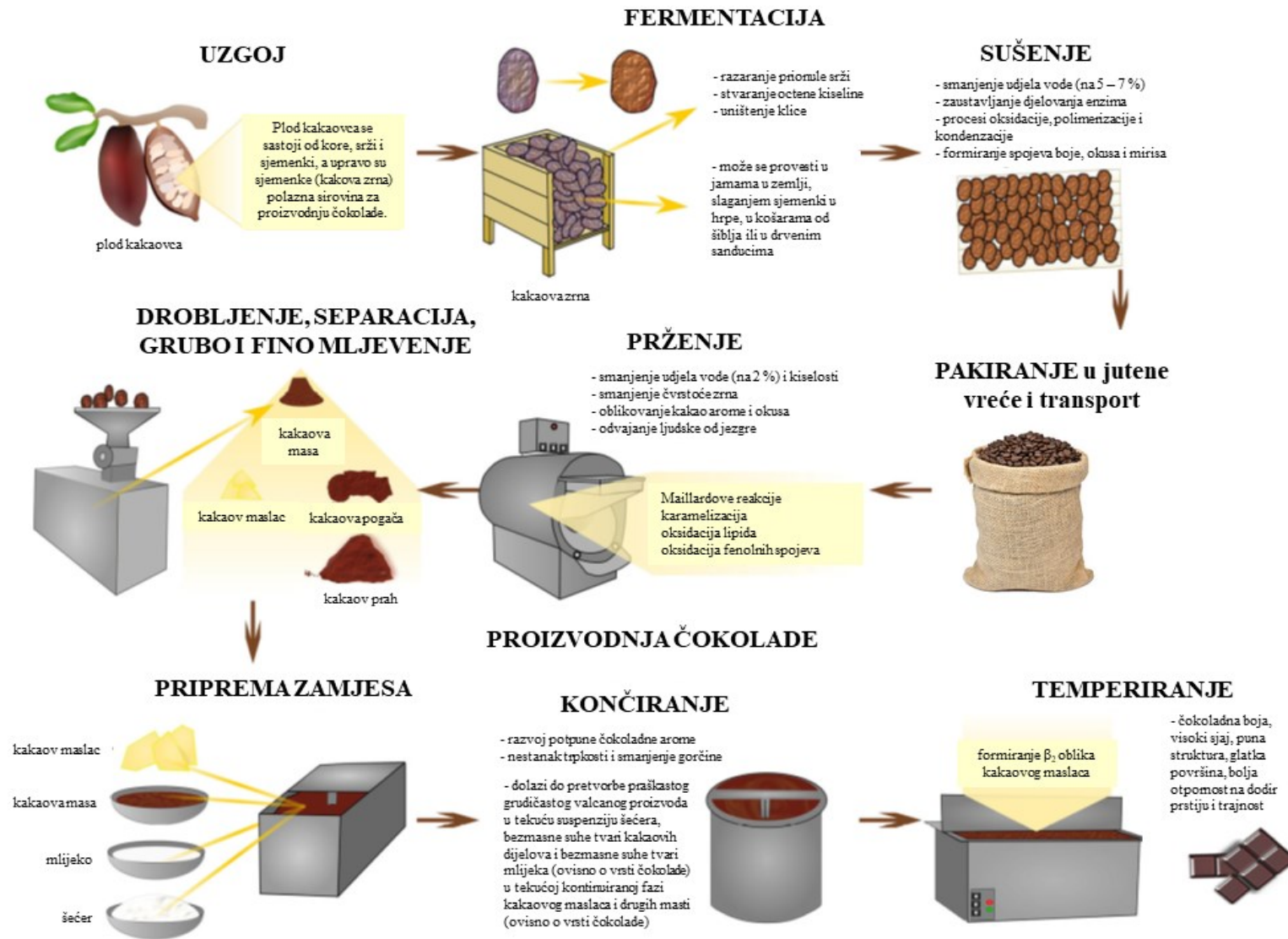


konačnim čokoladnim proizvodima je znatno niži uslijed degradacije kroz proces proizvodnje (Urbańska i sur., 2019).



Slika 17. Godišnja konzumacija čokolade po stanovniku u pojedinim zemljama (Statista, 2021b)

Fermentacija kakaovih zrna slijedi odmah nakon berbe, traje do 5 dana, ovisno o varijetetu, pri temperaturama do 50 °C i pri pH nižem od 4. Kombinacija kiselih uvjeta i viših temperatura dovodi do značajnih promjena u sastavu kakaovih zrna pri čemu endogeni enzimi imaju ključnu ulogu u formiranju prekursora arome i razgradnji pigmentata, a proces se može ubrzati dodavanjem komercijalnih enzima, kao što je pektinaza (Perez i sur., 2022). Osim prekursora aroma i okusa, kao što su slobodne aminokiseline nastale djelovanjem mikrobnih peptidaza, te peptidi i reducirajući šećeri, fermentacijom nastaju i nehlapivi i hlapivi spojevi arome, točnije alkoholi, kratkolančane organske kiseline, aldehidi i esteri (Kongor i sur., 2016; Frauendorfer i Schieberle, 2008). Međutim, fermentacija rezultira značajnim smanjenjem koncentracije slobodnih polifenola uslijed reakcija oksidacije i polimerizacije do netopljivih spojeva visoke molekulske mase, kao što su tanini (Perez i sur., 2022). Tijekom fermentacije, udjel polifenola smanjuje se čak i do 70 %, a udjel epikatehina, koji je glavni supstrat enzima polifenol oksidaze, čak i do 90 %. Antocijani se također brzo razgrađuju u procesu fermentacije gdje se njihov udjel može smanjiti i do 93 % nakon 4 dana (Urbańska i sur., 2019). Nakon fermentacije kakaovih zrna slijedi sušenje koje također ima važnu ulogu u smanjenju gorčine i trpkosti zrna. Osušena zrna su manje kisela zbog migracije hlapljivih kiselina prema površini, kao i zbog reakcija oksidacije octene kiseline (Kongor i sur., 2016).



Slika 18. Postupak proizvodnje čokolade (Perez i sur., 2022; Afoakwa, 2016)

Udjel alkohola, estera i pirazina raste tijekom procesa sušenja, dok se udjel kiselina, aldehida i ketona smanjuje, a kao i kod fermentacije, reakcije oksidacije i polimerizacije rezultiraju daljnjim smanjenjem udjela polifenola (Kongor i sur., 2016; Rodriguez-Campos i sur., 2011). Degradacija polifenola tijekom sušenja posljedica je visokih temperatura, difuzije spojeva iz zrna s vodom koja isparava te enzimskog procesa posmeđivanja. Tijekom procesa sušenja još uvijek je aktivna polifenol oksidaza koja katalizira transformaciju polifenola u kinone koji se podvrgavaju daljnjoj kondenzaciji sa slobodnim aaminskim i sulfhidrilnim skupinama što dovodi do sinteze smeđih polimera. Gubitak polifenola uslijed prženja je i do 30 % u odnosu na fermentirana zrna (Urbańska i sur., 2019). Tijekom prženja, koje najčešće traje 10 – 35 minuta pri temperaturama 120 – 140 °C, iz prekursora nastalih u prethodnim fazama nastaju brojni novi spojevi. Prekursori arome i okusa, odnosno slobodne aminokiseline, kratkolančani peptidi i reducirajući šećeri, podliježu Maillard-ovim reakcijama i Strecker-ovoj razgradnji pri čemu nastaju poželjni spojevi arome i okusa, a istovremeno dolazi i do povećanja udjela kiselina, aldehida, ketona i metilpirazina. Visoke temperature prženja u kombinaciji s uklanjanjem vode dovode i do karamelizacije šećera, oksidacije masti, smanjenja udjela esencijalnih masnih kiselina i esencijalnih aminokiselina, čime se smanjuje nutritivna vrijednost kakaovih zrna. Uslijed svih spomenutih reakcija, u ovoj se fazi razvija specifična aroma i okus čokolade, a kiselost i gorčina zrna još se više smanjuju daljnjim isparavanjem hlapivih kiselina. Smeđa boja nastaje prvenstveno zbog oksidacije i polimerizacije polifenola, razgradnje proteina, Maillard-ovih reakcija i dekstrinacije škroba (Perez i sur., 2022; Kongor i sur., 2016; Vítová i sur., 2009). Tijekom prženja dolazi do daljnje degradacije polifenola uslijed visokih temperatura, kao i do epimerizacije (-)-epikatehina u (-)-katehin i (+)-katehina u (+)-epikatehin te epimerizacije proantocijanidina. Udjel proantocijanidina velike molekulske mase smanjuje se na početku prženja, a zatim raste, vjerojatno zbog polimerizacije niskomolekularnih spojeva (Urbańska i sur., 2019). Fermentirana, sušena i pržena kakaova zrna dalje se melju, nakon čega se odvaja kakaov lom koji se koristi za proizvodnju kakaove mase, koja je jedan od sastojaka čokolade. Ovisno o vrsti čokolade, kakaova masa, kakaov maslac, emulgatori, šećer i mliječne sirovine koriste se za pripremu zamjesa za čokoladnu masu koja se potom podvrgava valcanju i končiranju, te u konačnici temperiranju (Slika 18) (Afoakwa, 2016). Svaki od tih procesa utječe na kemijski i bioaktivni sastav čokoladnog proizvoda zbog izloženosti toplini i prisutnosti kisika (Wollgast i Anklam, 2000). Končiranje se provodi kako bi se postigla odgovarajuća viskoznost, uklonio višak vode, razvila željena boja i uklonili ostaci hlapivih kiselina (octena kiselina), alkohola (uglavnom linalool i 2-feniletanol) i drugih spojeva koji mogu rezultirati neželjenom aromom (npr. ketoni i aldehidi) (Afoakwa i sur., 2008).



Uslijed viših temperatura (40 – 80 °C) i prisutnosti kisika, končiranje može rezultirati degradacijom polifenola (Urbańska i sur., 2019), ali ono se može znatno smanjiti primjenom više temperature kroz kraće vrijeme (Gültekin-Özgüven i sur., 2016). Temperiranje je nužno za postizanje stabilnog oblika kakaovog maslaca u čokoladnim proizvodima što utječe na njegova svojstva kvalitete (čokoladna boja, visoki sjaj, puna struktura, ravna i glatka površina, potrebna tvrdoća, itd.) (Ghazani i Marangoni, 2021; Afoakwa, 2016). Temperiranje se obično ne provodi pri temperatura višim od 45 °C te stoga ne rezultira degradacijom polifenolnih spojeva (Urbańska i sur., 2019). Ukupan gubitak polifenolnih spojeva tijekom procesiranja kakaovih zrna i proizvodnje čokolade može iznositi i do 90 % (Mehrinfar i Frishman, 2008).

2.5.5. Nove tehnologije u proizvodnji čokolade i trendovi na tržištu

Unatoč tome što je proizvodnja čokolade ustaljena tehnologija, kontinuirano se istražuju alternativna rješenja za određene korake u proizvodnji u svrhu brže, učinkovitije i ekonomičnije proizvodnje čokolade. Tako se već i kod kakaovih zrna preporuča korištenje starter kultura umjesto tradicionalnog prirodnog procesa fermentacije zrna čime se postiže bolja kontrola samog procesa (Urbańska i sur., 2019). Također, istražuje se mogućnost sušenja mikrovalovima i liofilizacijom kao zamjena tradicionalnom sušenju na suncu ili u sušarama, zbog kraćeg vremena sušenja i boljeg očuvanja kvalitete kakaovih zrna (Dzelagha i sur., 2020), a primjena mikrovalova istražuje se također i kod prženja kakaovih zrna (Schouteten i sur., 2023). Talijanska tvrtka ICAM je 2005. godine predložila novi koncept sušenja kakaovih zrna gdje farmeri koriste plastičnu foliju za pojačavanje sunčevih zraka što omogućava brže sušenje kakaovih zrna, a iste godine počela se primjenjivati u Ugandi. Točnije, posebni polietilenski listovi, obješeni na aluminijski okvir iznad kakaovih zrna, pretvaraju sunčeve ultraljubičaste zrake u infracrvene zagrijavajući zrna na 50 – 60 °C i omogućavajući brže i temeljitije sušenje (Taylor, 2005).

Nadalje, u proizvodnji čokolade sve se više primjenjuju kuglični mlinovi za usitnjavanje krutih čestica čokoladne mase, umjesto procesa valcanja i končiranja, zbog manjeg utroška energije i kraćeg trajanja procesa (Bolenz i sur., 2014). U kugličnom mlinu, vrtnjom okomite osovine s vodoravnim krakovima, veličina čestica uzorka smanjuje se uslijed kretanja kuglica, koje mogu biti izrađene od čelika, nehrđajućeg čelika, porculana ili drugih materijala, ili uslijed učinka smicanja između stijenke mlina i kuglica. U isto vrijeme, površina krutih čestica prekriva se masnoćom (Konar i Bingol, 2019). Također, melanžeri su se pokazali kao uspješna zamjena mlinovima s valjcima, u procesu valcanja, koji u 180 minuta mogu postići manju veličinu čestica u odnosu na trovaljke, a u procesu končiranja sve se više istražuju uređaji pod



vakuomom koji ubrzavaju isparavanje vode i hlapivih kiselina iz čokoladne mase (Hinne i sur., 2019). Zanimljivo je istaknuti i istraživanja vezana uz primjenu sonokristalizacije (kristalizacija potpomognuta ultrazvukom) u proizvodnji čokolade kao alternativa za konvencionalni proces temperiranja čokolade. U istraživanju Higaki i suradnika (2001), primjena ultrazvuka (20 KHz i 100 W) kroz 3 sekunde na kakaovom maslacu rezultirala je formiranjem stabilnog oblika V kakaovog maslaca, uz odsustvo drugih nestabilnih i nepoželjnih polimorfni oblika. Koriste se i automatizirani strojevi za temperiranje opremljeni sensorima i digitalnim kontrolama koji kontinuirano prate i konfiguriraju temperaturu, osiguravajući optimalne parametre za kristalizaciju stabilnog oblika kakaovog maslaca (Anonymous 12). Istražuje se također i tehnologija trodimenzijskog (3D) tiska u svrhu formulacije trodimenzijskih jestivih čokoladnih proizvoda, prilagođenog oblika i strukture, ekstrudiranjem i postupnim polaganjem nekoliko slojeva (Rando i Ramaioli, 2021). Inovacija u proizvodnji čokolade je i integracija Industrije 4.0 koja koristi podatke sa svih strojeva, uređaja i senzora u svakom postupku i omogućuje im da međusobno komuniciraju putem interneta kako bi donosili informirane i pravovremene odluke (Anonymous 13).

Umjetna inteligencija (engl. *artificial intelligence*) koristi se za istraživanje i stvaranje inovativnih okusa čokolade gdje algoritmi strojnog učenja analiziraju podatke o profilima okusa i preferencijama potrošača kako bi predvidjeli i razvili nove kombinacije okusa. Tehnologija proširene stvarnosti (engl. *augmented reality* - AR) podiže iskustvo potrošača na višu razinu oživljavanjem pakiranja čokolade. Skeniranjem QR koda ili AR markera na pakiranju čokolade, potrošači mogu pristupiti interaktivnim sadržajima, poput videa, recepata i priče o podrijetlu čokolade, što povezuje potrošače s tehnologijom proizvodnje čokolade (Anonymous 12).

Aktualni trendovi tržišta čokoladnih proizvoda posljednjih godina usmjereni su na proizvodnju organske, veganske i „raw“ čokolade bez dodanog šećera, a sve veći broj potrošača traži čokolade obogaćene vitaminima, mineralnim tvarima, prehrambenim vlaknima i polifenolima, s istaknutim zdravstvenim tvrdnjama (Mordor Intelligence, 2022). Istraživanje vezano uz trendove na tržištu čokolade provedeno 2023. godine u 50 zemalja i koje je uključivalo 20 000 potrošača i *online* analize podataka pomoću umjetne inteligencije, pokazalo je da današnji potrošači pozitivno raspoloženje percipiraju dijelom dobrog zdravlja te da čak 65 % njih preferira hranu koja doprinosi mentalnom zdravlju, odnosno smanjenju tjeskobe i stresa. Većina njih (68 %) smatra da dodatak biljnih sastojaka u čokoladu doprinosi njenom boljem učinku na zdravlje i dobrom raspoloženju. Stoga, čokolada kao hrana koja djeluje pozitivno na raspoloženje je među tri aktualna trenda na tržištu čokolada u 2024. godini. Također, veliki dio

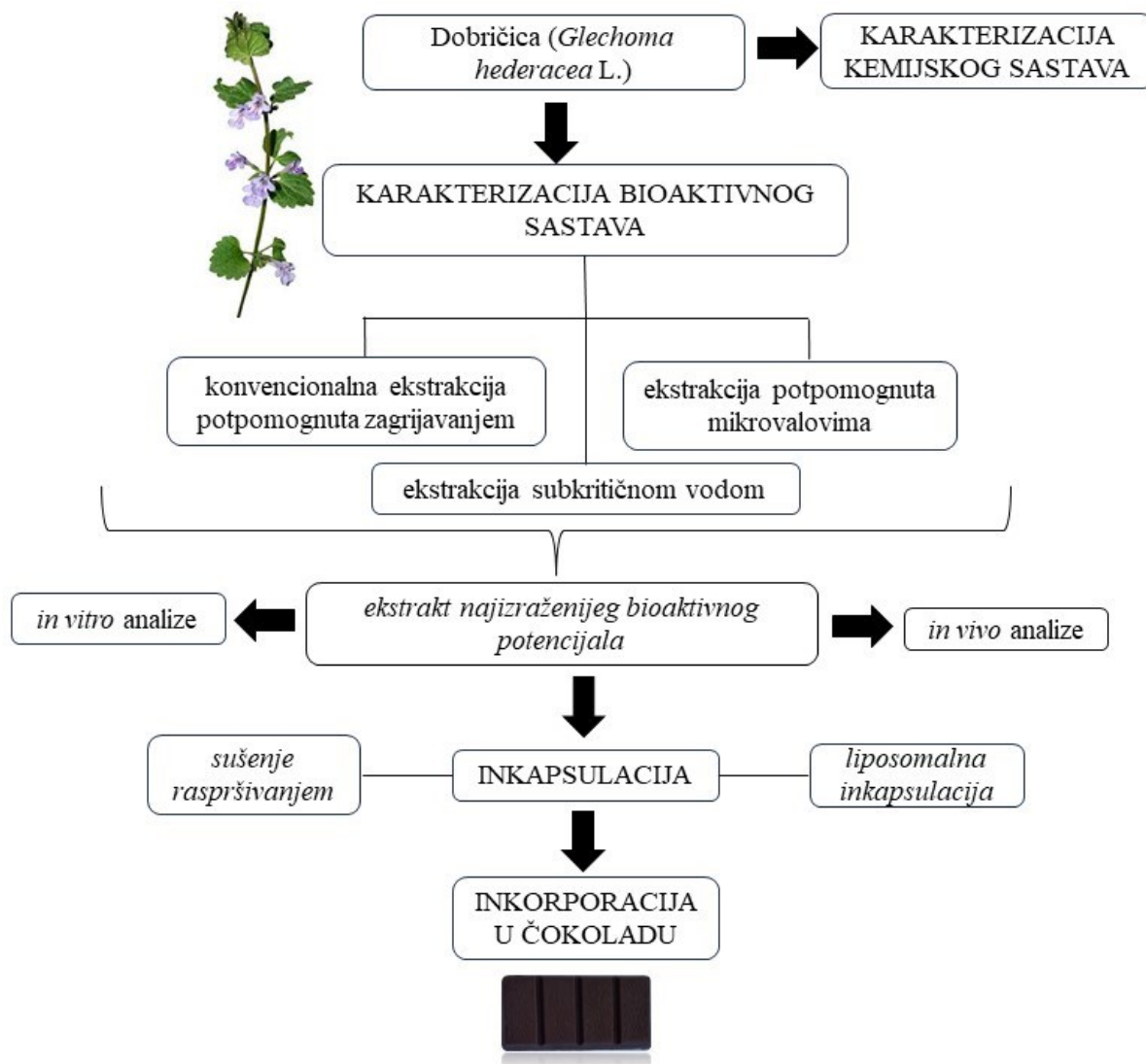


potrošača (68 %) zainteresiran je za proizvode iz održivog uzgoja, koje prepoznaju prema određenim certifikatima, i što predstavlja drugi trend u industriji čokolade za 2024. godinu. Istraživanje je također pokazalo da 56 % potrošača u svijetu kupuje hranu biljnog podrijetla barem jednom mjesečno i da mnogi konzumiraju konditorske i brašнено-konditorske proizvode biljnog podrijetla bez osjećaja krivnje jer su potrošači sve svjesniji utjecaja prehrambene industrije na klimatske promjene i to uzimaju u obzir pri kupovnim odlukama, što vegansku čokoladu čini logičnim izborom i trećim trendom u 2024. godini (Anonymous 14). Najpopularniji okusi čokoladnih proizvoda u 2024. godini su lješnjak, badem, karamel, kikiriki i kokos, a potrošači traže i čokolade gorkog okusa, koji proizlazi iz većih udjela kakaovih dijelova, jer takvu čokoladu smatraju „zdravijom“. Od biljnih okusa u čokoladi najpopularniji su kamilica, ruža i kozokrvina, a od voćnih guava, dinja, marakuja i nar (Anonymous 15).



3. Eksperimentalni dio

PLAN PROVEDBE ISTRAŽIVANJA



Slika 19. Shematski prikaz provedbe istraživanja

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

U ovome istraživanju, korišteni su uzorci biljke dobričice (*Glechoma hederacea* L.) sakupljeni na području kontinentalne Hrvatske u travnju 2020. godine. Tijekom sakupljanja biljka je bila u fazi cvjetanja. Identifikaciju i sakupljanje uzoraka obavili su botaničari s prethodnim iskustvom u sakupljanju biljnog materijala. Oznake uzoraka te lokacija sakupljanja prikazani su na Slici 20 i Tablici 9.

Nakon sakupljanja, nadzemni dijelovi uzoraka dobričice sušeni su na zraku, zaklonjeni od izravnog sunčevog utjecaja, do udjela suhe tvari > 90 %. Nakon sušenja, uzorci su usitnjeni te prosijani pri čemu se u svim daljnjim analizama i eksperimentima koristila frakcija čestica veličine < 450 μm , prema planu provedbe istraživanja (Slika 19).



Slika 20. Geografski prikaz lokacija sakupljanja uzoraka dobričice na području Republike Hrvatske

Uzorak dobričice D3 pohranjen je u herbarijskoj zbirci Herbarium Croaticum (Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska) pod brojem 71767.



Tablica 9. Oznake uzoraka, mjesto i županija sakupljanja

Uzorak	Mjesto sakupljanja	Županija sakupljanja
D1	Lobor	Krapinsko-zagorska županija
D2	Park Maksimir	Grad Zagreb
D3	Bilogora	Bjelovarsko-bilogorska županija
D4	Sveti Ilija	Varaždinska županija
D5	Donja Voća	Varaždinska županija
D6	Sikirevci	Brodsko-posavska županija
D7*	Sikirevci	Brodsko-posavska županija

*dobričica velikih listova

3.1.2. Biološki test sustavi

U ovome istraživanju korištene su kontinuirane humane stanične linije, Gram pozitivne i Gram negativne bakterije i pokusne životinje.

a) Radni mikroorganizmi

Bakterije *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* i *Staphylococcus aureus*, korištene u ovome istraživanju, su dio Zbirke organizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska). Bakterije se prije uporabe inokuliraju u odgovarajuću tekuću hranjivu podlogu i inkubiraju određeno vrijeme pri optimalnoj temperaturi rasta.

- *Hranjive podloge za bakterije*

LB (engl. *Luria-Bertani*) hranjiva podloga korištena je za kultivaciju bakterije *Escherichia coli*, MRS (engl. *Man, Rogosa and Sharpe broth*) hranjiva podloga za bakteriju *Lactobacillus plantarum* i M9-minimalna hranjiva podloga s manitolom za bakteriju *Staphylococcus aureus*. Sastav hranjivih podloga prikazan je u Tablicama 10 – 12. Korištene su sterilizirane podloge, a u svrhu dobivanja krutih podloga dodano je 15 g L⁻¹ agara u tekuće hranjive podloge.



Tablica 10. Sastav LB hranjive podloge u tekućem obliku

Sastojak	Količina
Bakto-tripton	10 g
Kvašćev ekstrakt	5 g
Natrijev klorid	5 g
Demineralizirana voda	1000 mL

Tablica 11. Sastav MRS hranjive podloge u tekućem obliku

Sastojak	Količina
MRS Broth	55,2 g
Demineralizirana voda	1000 mL

Tablica 12. Sastav M9 minimalne hranjive podloge s manitolom u tekućem obliku

Sastojak	Količina
Dinatrijev fosfat	6 g
Kalijev dihidrogen fosfat	3 g
Natrijev klorid	0,5 g
Amonijev klorid	1 g
Demineralizirana voda	1000 mL
*Magnezijev sulfat (1 M)	2 mL
*Kalcijev klorid (1 M)	100 μ L
*20 %-tni manitol	10 mL
*Tiamin (10 mg mL ⁻¹)	100 μ L

*Označene komponente M9 hranjive podloge steriliziraju se filtracijom kroz membranski filter te se dodaju u ostatak podloge nakon toplinske sterilizacije.

b) Humane stanične linije

U ovome istraživanju korištene su kontinuirane humane stanične linije pločastog epitela karcinoma jezika Cal27 (ATCC CRL-2095), hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 (ATCC HB-8065), adenokarcinoma epitela želuca AGS (ATCC CRL-1739) i adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 (ATCC HTB-37). Stanične linije Cal27, HepG2 i Caco-2 uzgajane su u monosloju u T-bocama u hranjivom mediju RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) s



10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum* – FBS), a AGS stanična linija u Ham's F-12 mediju. Za kultivaciju staničnih linija korišten je inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ (5 %) pri temperaturi od 37 °C. Stanične linije su prije analiza bile podvrgnute postupku tripsinizacije, uz dodatak 0,25 %-tne otopine tripsina, koji je bio zaustavljen nakon 10 minuta dodatkom medija sa serumom. Koncentracija stanica od 10⁵ stanica mL⁻¹ određena je pomoću Bürker-Türk komorice.

c) Pokusne životinje

U svrhu *in vivo* eksperimenata korišteni su štakori soja Sprague Dawley uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska) te štakori soja Wistar uzgojeni na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (Hrvatska). Za istraživanje je izdano pozitivno mišljenje Etičkog povjerenstva EP 274/2019 te je isto istraživanje odobreno od Ministarstva poljoprivrede (broj odobrenja: HR-POK-012). Istraživanje je provedeno u skladu sa zakonskim i etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon, NN 102/2017; Pravilnik, NN 55/2013). Štakori su hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, a voda im je bila stalno dostupna *ad libitum*. Tijekom cijelog eksperimenta pokusne životinje držane su u kontroliranim uvjetima uključujući temperaturu od 25 ± 1 °C i vlažnost zraka u rasponu 50 ± 10 %.

3.1.3. Sirovine za proizvodnju čokolade

Za izradu čokolada korišteni su kakaova masa i kakaov maslac proizvođača Barry Callebaut (Švicarska), šećer u prahu proizvođača Franck d.d. (Hrvatska) i suncokretov lecitin dobavljača Nutrimedica d.o.o. (Hrvatska).

3.1.4. Kemikalije

- 2-tiobarbiturna kiselina, Sigma-Aldrich, Njemačka
- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Aceton, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Acetonitril, Fischer Scientific, SAD
- Agar, Biolife, Italija
- Agaroza niske točke tališta (LMP), Invitrogen, UK
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), Lonza, SAD



- Albumin iz goveđeg seruma (BSA), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Amonijev karbonat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Amonijev klorid, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Apigenin (> 97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Askorbinska kiselina, Kemika d.d., Hrvatska
- Bakrov sulfat pentahidrat, Acros Organics, SAD
- Bakto-tripton, Biolife, Italija
- Borna kiselina, T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- Bromkrezol-zeleno, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Bromtimol plavo, Kemika d.d., Hrvatska
- Celite 545, Merck, Njemačka
- DCFH-DA (2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika d.d., Hrvatska
- Dinatrijev fosfat, Fisher Scientific, Engleska
- DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin), Sigma-Aldrich, Njemačka
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal), Sigma-Aldrich, Njemačka
- DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Dušična kiselina, Carlo Erba, Španjolska
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- Enzimski set za određivanje vlakana, Megazyme, Irska
- (-)-Epikatehin (> 98 %), Sigma Aldrich, Njemačka
- Etanol, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Etidijev bromid, Sigma Aldrich, Njemačka
- Etilni acetat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika d.d., Hrvatska



- Galna kiselina (> 97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Glicerol, Kemika d.d., Hrvatska
- Glutation reduktaza, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Gvanidin hidroklorid, Sigma Aldrich, Njemačka
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Izooktan, Fischer Scientific, UK
- Kafein, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kafeinska kiselina (> 97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Kalij natrij tartarat tetrahidrat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Kalijev bromid, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalijev dihidrogen fosfat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalijev hidroksid, Kemika d.d., Hrvatska
- Kalijev klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Karboksimetil celuloza, Biosynth, Švicarska
- Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selena), Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka
- Kloroform, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Klorogenska kiselina (> 97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Klorovodična kiselina, Kemika d.d., Hrvatska
- Kolagen hidrolizat, Biosynth, Švicarska
- Kriptoklorogenska kiselina (> 98 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Ksilan (> 95 % ksilooligosaharida), Carl Roth, Njemačka
- Kvašćev ekstrakt, Biolife, Italija
- Ledena octena kiselina, Kemika d.d., Hrvatska



- Luteolin (> 98 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Magnezijev klorid heksahidrat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Magnezijev sulfat heptahidrat, Kemika d.d., Hrvatska
- Manitol, Difco, SAD
- Metanol, J.T. Baker, SAD
- Metil-crveno, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Mravlja kiselina, Carlo Erba, Španjolska
- MRS Broth, Biolife, Italija
- Mucin (75 – 95 %), Carl Roth, Njemačka
- NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat), AppliChem GmbH, Njemačka
- Natrijev hidrogensulfit, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev citrat, T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- Natrijev dodecil-sulfat (SDS), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Natrijev hidrogen fosfat, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev hidrogen karbonat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev karbonat, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev laurilsarkozinat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Natrijeva sol alginatne kiseline (iz smeđih algi; niske viskoznosti), Sigma-Aldrich Njemačka
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), Sigma-Aldrich, Njemačka
- *n*-heksan, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Nutrioz (Nutriose[®] FM 10), Roquette Frères, Francuska
- Octena kiselina, J.T. Baker, SAD



- Pankreatin iz svinjskog pankreasa, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Pepsin iz svinjske želučane sluznice (≥ 250 U mg⁻¹), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Perklorna kiselina, Fisher Scientific, Engleska
- Phospholipon 90 G ($\geq 94,0$ % fosfatidilkolin), Lipoid GmbH, Njemačka
- Plazmid PhiX174 RF1 DNA, Promega, SAD
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, Corning, SAD
- Rutin trihidrat (> 97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Ružmarinska kiselina (97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Salivarna α -amilaza (300 – 1500 U mg⁻¹), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Set za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze, Cayman Chemical Company, SAD
- Sumporna kiselina, Carlo Erba, Španjolska
- Teobromin (> 98 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Tiamin-hidroklorid, Koch-light Ltd, UK
- Trikloroocetna kiselina, Fisher Scientific, Engleska
- Tripsin, Capricorn Scientific, Njemačka
- Tris-HCl, Invitrogen, SAD
- Triton X-100, Acros Organics, SAD
- Trizma[®] Base, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) (> 98 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Vodikov peroksid, Kemika d.d., Hrvatska
- Željezov(III) klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Žuč goveda, Sigma-Aldrich, Njemačka

3.1.5. Oprema

- AFM sustav za mikroskopiju atomskih sila, Bruker, SAD



- Analitička vaga, New Classic MF, Mettler Toledo AG, Švicarska
- Analitički sakupljač frakcija Agilent 1260 Infinity II, Agilent Technologies, SAD
- Blok za spaljivanje i aspiracijski modul, Tecator, Foss, Danska
- Centrifuga SL8/8R, Thermo Scientific, SAD
- Čitač mikropločica Infinite[®] M Plex, Tecan, Švicarska
- Diferencijalni pretražni kalorimetar, Mettler Toledo DSC 823[°], Švicarska
- Epifluorescencijski mikroskop, Leica Microsystems GmbH, Njemačka
- FT-IR spektroskop, Nicolet iS10, Thermoscientific, Švedska
- FT-IR spektroskop, Spectrum Two, Perkin Elmer, SAD
- Goniometar, DataPhysics OCA 20, Njemačka
- ICP-AES instrument (atomska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu), Mason, SAD
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Forma Scientific, SAD
- Invertni svjetlosni mikroskop, Optika Microscopes, Italija
- Kjeltec 2100 uređaj (destilacijska jedinica Kjeldahl), Foss, Danska
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, Iskra, Slovenija
- Laboratorijski sušionik, Instrumentaria, Hrvatska
- Liofilizator, Martin Christ GmbH, Njemačka
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg Labortechnik GmbH, Njemačka
- Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern, UK
- Malvern Zetasizer Ultra, Malvern, UK
- Melanžer, Twin Stone, SAD
- Modularno kompaktni reometar MCR 102e, Anton Paar, Austrija
- Mufolna peć KR-170, Heraeus, Njemačka
- NIR spektroskop NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m s instaliranim programom CDI software Spec32, Control Development, Inc, SAD



- NMR uređaj, Minispec mq-one SFC Analyzer, Bruker, SAD
- Plinski kromatograf ATI Unicam 610, UK
- Plinski piknometar Ultrapyc 3000, Anton Paar, Austrija
- Rotacioni vakuum uparivač RV8, IKA, Njemačka
- SEM mikroskop TESCAN Mira3, Češka Republika
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa, Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd, UK
- Sušionik s raspršivanjem, mini Büchi B-290, Büchi Labortechnik, Švicarska
- Svjetlosni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Tehnička vaga, A&D Instruments, UK
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies, SAD
- Termogravimetar, TA Instruments Q500, SAD
- TripleQuad 6460 LC/MS sustav, Agilent Technologies, SAD
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, Elma, Njemačka
- Uređaj za ekstrakciju subkritičnom vodom, Đuro Đaković Aparati d.o.o. (opisan u radu Jokić i suradnika, 2018), Hrvatska
- Uređaj za elektroforezu, Life Technologies, SAD
- Uređaj za ispitivanje teksture TA.HD.plus, Stable Micro Systems, UK
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz hrane, Ethos Easy, Italija
- Uređaj za obradu hrane pulsirajućim svjetlom, Z-1000, Polytec, Njemačka
- UV-Vis spektrofotometar Genesys 10S, Thermo Scientific, SAD
- Vodena kupelj Inko VKZ ERN, Inkolab d.o.o., Hrvatska
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co., Kina



3.2. Metode

3.2.1. Određivanje kemijskog sastava uzoraka dobričice

Određivanje udjela suhe tvari provedeno je sušenjem uzoraka u sušioniku na 105 °C do konstantne mase (AOAC 930.15; Padmore, 1990a), određivanje udjela proteina provedeno je slijedeći metodu po Kjeldahl-u (AOAC 976.05; Padmore, 1990b), određivanje udjela masti provedeno je koristeći Soxhlet ekstraktor i *n*-heksan kao otapalo (AOAC 920.39; Padmore, 1990c), a određivanje udjela pepela provedeno je spaljivanjem uzorka u mufolnoj peći (AOAC 942.05; Padmore, 1990d). Udjel topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana velike molekulske mase određen je koristeći enzimsko-gravimetrijsku metodu (AOAC 2011.25; McCleary i sur., 2012). Analiza masnih kiselina u ekstrahiranoj lipidnoj frakciji provedena je plinskom kromatografijom uz helij kao mobilnu fazu (HRN EN ISO 12966, 2015). Mikroelementi i makroelementi određeni su atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) (Vihnanek Lazarus i sur., 2013).

3.2.2. Određivanje polifenolnog sastava uzoraka dobričice

3.2.2.1. Optimiranje pojedinih tehnika ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice

Ekstrakcija polifenolnih spojeva provedena je primjenom tri tehnike: konvencionalnom ekstrakcijom potpomognutom zagrijavanjem (engl. *heat-assisted extraction* – HAE), ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction* – MAE) i ekstrakcijom subkritičnom vodom (engl. *subcritical water extraction* – SWE). Optimiranje uvjeta ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice provedeno je u programu Design Expert (version 12) (Minneapolis, SAD) koristeći metodu odzivnih površina (engl. *response surface methodology*) i centralno kompozitni dizajn. Uzorak D3 korišten je kao materijal za definiranje optimalnih parametara ekstrakcija. Nezavisne varijable primjenjivanih tehnika ekstrakcija prikazane su u Tablici 13, dok su kod svih tehnika zavisne varijable bile udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet (određen ABTS i DPPH metodama) te su predstavljale odziv u eksperimentalnom dizajnu za optimiranje tehnika ekstrakcija. Modeli i koeficijenti regresije smatrali su se značajnima pri $p < 0,05$.

U slučaju tehnike MAE, snaga mikrovalova održavana je na 900 W dok nije postignuta željena temperatura ekstrakcije, a tehnika SWE provedena je u uređaju opisanom u radu Jokić i suradnika (2018). Prilikom svih navedenih ekstrakcija kao otapalo korištena je demineralizirana voda. Svaka ekstrakcija provodila se u triplikatu. Nakon ekstrakcije svi su uzorci centrifugirani



(9500 rpm, 20 minuta, 4 °C) te filtrirani (Whatman® 4 filter papir). Pripremljeni ekstrakti čuvani su na -18 °C do daljnjih analiza.

Tablica 13. Nezavisne varijable primjenjivanih tehnika ekstrakcija

Tehnika ekstrakcije	Vrijeme (minute)			Temperatura (°C)			Omjer uzorak/otapalo (g mL ⁻¹)		
HAE	10	20	30	80	90	100	0,01	0,025	0,04
MAE	3	6	9	50	70	90	0,01	0,025	0,04
SWE	5	10	15	120	160	200	0,01	0,025	0,04

HAE – konvencionalna tehnika ekstrakcije potpomognuta zagrijavanjem; MAE - ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom

3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Udjel ukupnih polifenola u pripremljenim ekstraktima dobričice određen je spektrofotometrijski koristeći metodu modificiranu prema radu Singleton i Rossi (1965). Reakcijska smjesa sastojala se od 100 µL uzorka, 7,9 mL demineralizirane vode, 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa razrijeđenog s vodom (1:2) i 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata. Apsorbancija reakcijske smjese mjerila se nakon 2 sata na valnoj duljini od 765 nm. Baždarna krivulja izrađena je koristeći otopine galne kiseline različite koncentracije (25 – 250 µg mL⁻¹).

3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

U radu je primijenjena metodologija Brand-Williams i suradnika (1995). Reakcijska smjesa sastojala se od 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH u metanolu i 100 µL uzorka. Apsorbancija reakcijske smjese mjerila se na 515 nm nakon 30 minuta. Baždarna krivulja izrađena je koristeći otopine Trolox-a različite koncentracije (25 – 250 µg mL⁻¹).

3.2.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (Re i sur., 1999) uzoraka pripremila se otopina ABTS^{•+} radikala oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Na dan analize otopina se razrijedila etanolom do konačne koncentracije ABTS^{•+} radikala od 1 % tako da apsorbancija te otopine iznosi 0,70 ± 0,02 na 734 nm. Reakcijska smjesa sastojala se od 4 mL



otopine ABTS⁺ radikala te 40 μ L uzorka, a apsorbancija se mjerila na valnoj duljini od 734 nm nakon 6 minuta. Baždarna krivulja izrađena je koristeći otopine Trolox-a različite koncentracije (25 – 250 μ g mL⁻¹).

3.2.2.5. Određivanje udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-PDA)

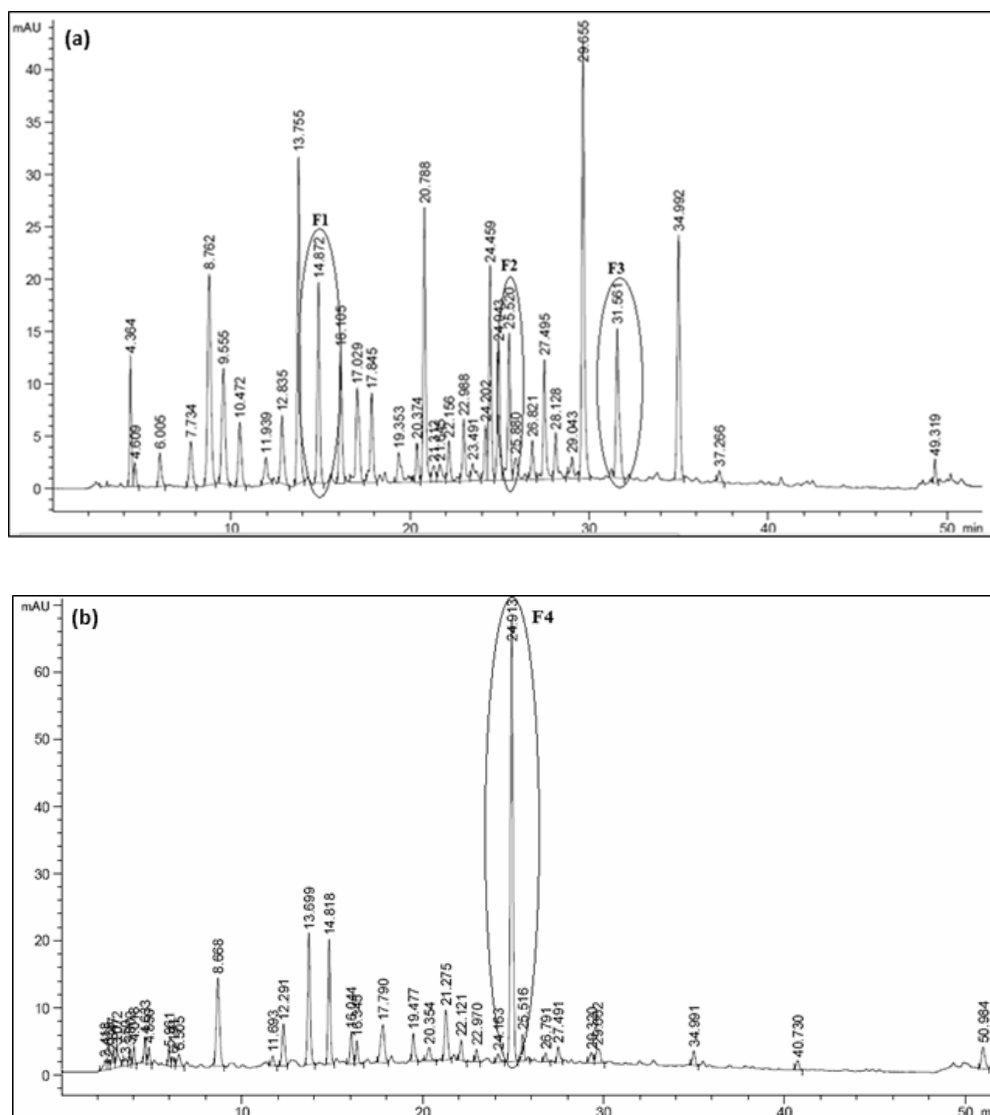
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 s Zorbax Extend C18 (4,6 \times 250 mm, 5 μ m i.d.) kolonom (Agilent Technologies, SAD) spojene s detektorom s nizom fotodioda (engl. *photodiode array detector* - PDA). Elucija je provedena gradijentno s dvokomponentnom mobilnom fazom koja se sastojala od 1 %-tne otopine mravlje kiseline u vodi (A) i 1 %-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu (B), prema režimu elucije prikazanom u Tablici 14, i pri protoku 1 mL min⁻¹. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 5 μ L, a temperatura kolone bila je 25 °C. Analiti su detektirani PDA detektorom pri valnim duljinama od 320 i 350 nm.. Svi uzorci su filtrirani kroz 0,45 μ m membranski filter (Nylon Membranes, SAD) prije analize, a analize svih uzoraka provedene su u duplikatu.

Tablica 14. Režim elucije za primijenjenu HPLC metodu

Vrijeme (minute)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL min ⁻¹)
0	93	7	1,00
5	93	7	1,00
45	60	40	1,00
47	30	70	1,00
52	30	70	1,00

Na dobivenim kromatogramima ekstrakata bilo je vidljivo dobro razdvajanje pikova, no, zbog nedostatka odgovarajućih standarda pojedini pikovi se inicijalno nisu mogli identificirati. Stoga su reprezentativni ekstrakti dobričice (uzorak D5 – MAE i SWE) podvrgnuti frakcioniranju pomoću analitičkog sakupljača frakcija, a sakupljene frakcije (F1, F2, F3 i F4; Slika 21) analizirane su sinergijom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS).





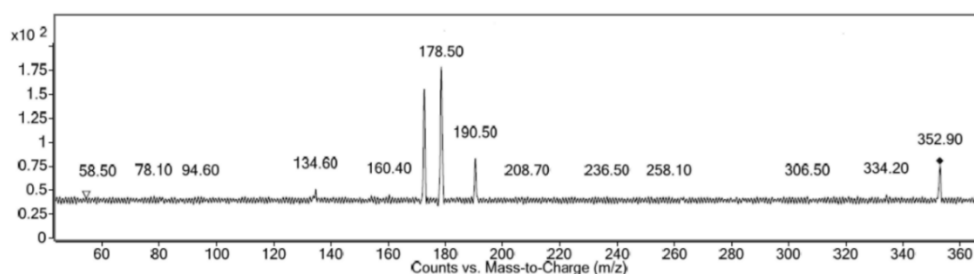
Slika 21. Kromatogrami (snimljeni na 320 nm) ekstrakta dobričice (uzorak D5) dobiveni: a) ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima i b) ekstrakcijom subkritičnom vodom; i izdvojene frakcije F1, F2, F3 i F4

Za identifikaciju izdvojenih frakcija korišten je 6460 TripleQuad LC/MS sustav (Agilent Technologies, SAD) i ionizacija elektroraspršenjem u kombinaciji s kolonom Zorbax Eclipse C18 (2,1 mm × 50 mm, 1,8 μm i.d.; Agilent Technologies, SAD) zagrijanoj na temperaturu od 30 °C. Izokratna elucija provedena je s 0,1 %-tnom otopinom mravlje kiseline u 50 %-tnoj (v/v) otopini acetonitrila pri protoku 0,4 mL min⁻¹. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 1 μL. Parametri izvora iona bili su sljedeći: temperatura plina 250 °C, protok plina 7 L min⁻¹, tlak 40 psi, kapilarni napon 3500 V i inicijalni napon fragmentora 200 V. Dominantni ioni frakcija dobiveni ionizacijom bili su odabrani za fragmentaciju. Napon fragmentora bio je optimiran za ciljane prekursore u odabranom načinu rada praćenja iona (MS 2 SIM). Za fragmentaciju,



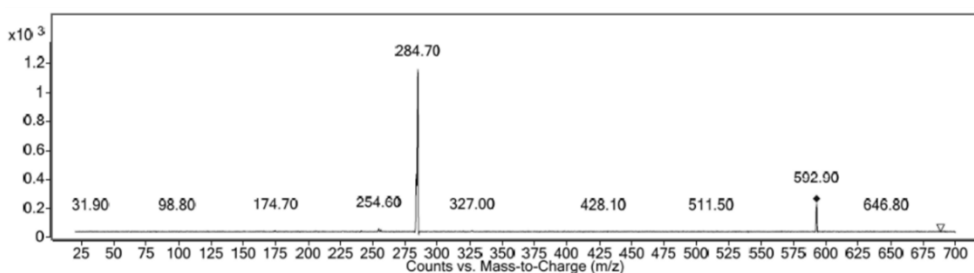
maseni spektrometar je radio u načinu produktivnih iona, a kolizijska energija bila je postavljena na 5 – 40 eV. MS/MS spektri snimljeni su u negativnom ili pozitivnom načinu rada, ovisno o frakciji.

LC-MS/MS analiza frakcije F1 rezultirala je $[M-1]^-$ ionom u načinu negativnog skeniranja na m/z 353 u skladu s molekulskom formulom $C_{16}H_{18}O_9$. Njegovom fragmentacijom nastala su 3 pika na m/z 191, 179 i 173 (Slika 22) što, prema literaturi (Fang i sur., 2002), upućuje na prisutnost izomera kafeoilkininske kiseline. Daljnja HPLC-PDA analiza s odgovarajućim HPLC standardom utvrdila je da se radi o kriptoklorogenskoj kiselinu.



Slika 22. Profil fragmentacije dominantnog iona u frakciji F1, m/z 353

Nadalje, analiza frakcije F2, LC-MS/MS rezultirala je $[M-1]^-$ ionom u načinu negativnog skeniranja na m/z 593 što odgovara molekulskoj formuli $C_{27}H_{30}O_{15}$, a fragmentacija je rezultirala pikom na m/z 285 (Slika 23) što, prema literaturi (Hossain i sur., 2010), upućuje na prisutnost luteolin-7-*O*-rutinozida.



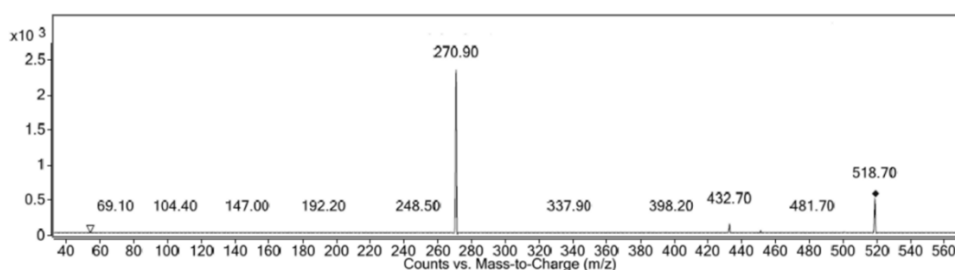
Slika 23. Profil fragmentacije dominantnog iona u frakciji F2, m/z 593

U nedostatku prikladnog HPLC standarda, identifikacija je dalje potvrđena podvrgavanjem frakcije F2 kiselinskoj hidrolizi koja bi trebala rezultirati oslobađanjem luteolina iz njegovog konjugiranog oblika glikozida. U tu svrhu, sakupljena frakcija je uparena do suhog pod dušikom, a suhi ostatak je podvrgnut kiselinskoj hidrolizi s 2 M otopinom klorovodične kiseline (1 sat, 80 °C). Ohlađeni hidrolizat se razrijedio s 5 M otopinom natrijevog klorida i vodom kako bi se dobila 2 M otopina natrijevog klorida u definiranom volumenu (Arruda i sur., 2018).



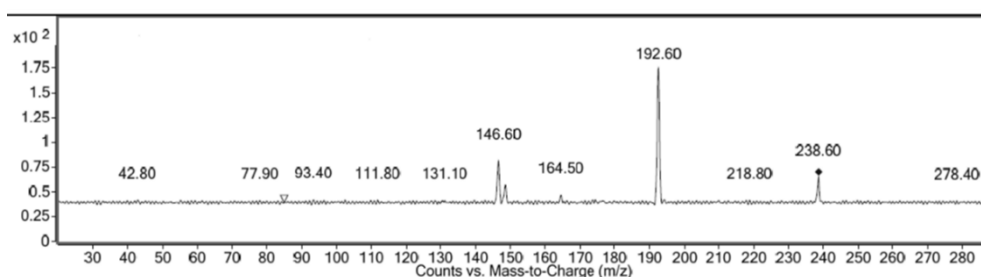
Ekstrakcija oslobođenog luteolina provedena je ekstrakcijom tekuće-tekuće etilnim acetatom. Etilni acetat je potpuno uparen pod dušikom, dok je suhi ostatak otopljen u definiranom volumenu etanola i podvrgnut HPLC-PDA analizi. Kiselinska hidroliza rezultirala je oslobađanjem luteolina u obliku aglikona i time potvrdila prisutnost glikoziliranog luteolina u ekstraktu dobričice.

LC-MS/MS analiza frakcije F3 rezultirala je ionom $[M+1]^+$ u načinu pozitivnog skeniranja na m/z 519 (molekulska formula $C_{24}H_{22}O_{13}$), a njegov molekularni ion $[M-1]^+$ dao je dva pika na m/z 271 i 433 (Slika 24) što, prema literaturi (Atoui i sur., 2005), upućuje na prisutnost apigenin 7-(6" malonil glikozida). Identifikacija je dalje potvrđena kiselinskom hidrolizom slijedeći isti postupak kao i za frakciju F2.



Slika 24. Profil fragmentacije dominantnog iona u frakciji F3, m/z 519

Za razliku od F1, F2 i F3, frakcija F4 (Slika 25) je ostala neidentificirana, a objašnjenje je dano u poglavlju *Rasprava (poglavlje 5.3.)*.



Slika 25. Profil fragmentacije dominantnog iona u frakciji F4, m/z 239

Identifikacija nakon HPLC-PDA analize polifenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskih vremena i karakterističnih apsorpcijskih spektara (190 – 400 nm) s komercijalno dostupnim standardima, a kvantifikacija izradom baždarnih krivulja odgovarajućih standarda ($2 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Za pikove koji odgovaraju frakcijama F2 i F3, kvantifikacija je provedena korištenjem komercijalnih standarda luteolina i apigenina.



3.2.2.6. Analiza ekstrakata blisko infracrvenom (NIR) spektroskopijom

Ekstrakti dobričice analizirani su NIR spektroskopijom (engl. *near-infrared spectroscopy*) u području spektra od 904 do 1699 nm. Svaki uzorak sniman je 3 puta te je iz dobivenih rezultata izračunata srednja vrijednost. Na dijelu NIR spektra koji je pokazao razlike između uzoraka provedena je PCA analiza (engl. *principal component analysis*) u programu XLStat (MS Excel, Microsoft, Redmond, SAD).

3.2.3. Priprema ekstrakta dobričice za *in vitro* i *in vivo* analize

Uzimajući u obzir rezultate preliminarnih analiza ekstrakata pripremljenih različitim tehnikama, za daljnje provođenje *in vitro* i *in vivo* analiza korišten je uzorak D3. Ekstrakt je pripremljen koristeći optimalne parametre HAE tehnike (poglavlje 4.2.1.). Pripremljeni ekstrakt koncentriran je pod vakuumom koristeći rotacioni uparivač do 10 x manjeg volumena, nakon čega je bio smrznut na – 80 °C kroz 12 sati i podvrgnut liofilizaciji kroz 24 sata kako bi se dobio praškasti liofilizat ekstrakta, koji je korišten za *in vitro* i *in vivo* analize.

3.2.4. *In vitro* analize ekstrakta dobričice

3.2.4.1. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama

Određivanje citotoksičnog, odnosno proliferativnog, učinka ekstrakta dobričice u različitim koncentracijama (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) na humane stanične linije Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 provedeno je koristeći „Neutral red“ metodu (Repetto i sur., 2008). U mikrotitarske ploče prebačeno je 100 µL suspenzije staničnih linija (10⁵ stanica mL⁻¹) nakon čega je slijedila kultivacija kroz 24 sata. Potom su stanične linije tretirane sa 100 µL otopina različitih koncentracija ekstrakta dobričice, pripremljenih u odgovarajućem hranjivom mediju. Kontrola je umjesto ekstrakta, sadržavala isti volumen hranjivog medija. Tretman stanica trajao je 2 i 24 sata, a po završetku je uklonjen hranjivi medij s ekstraktom te je u svaku jažicu dodano 100 µL radne otopine Neutral red boje (Tablica 15). Slijedila je inkubacija (45 minuta, 37 °C) i ispiranje sa 100 µL PBS pufera. Potom je u svaku jažicu dodano 100 µL otopine za odbojavanje (Tablica 15). Intenzitet obojenja izmjeren je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm te je proporcionalan preživljenju stanica koje se računa prema formuli [1]:

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{A_{540} (\text{ekstrakt})}{A_{540} (\text{kontrola})} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je A₅₄₀ vrijednost apsorbancije izmjerene na 540 nm.



Tablica 15. Sastav ishodišne i radne otopine Neutral red-a i otopine za odbojavanje

	Sastojak	Količina
Ishodišna otopina Neutral red-a (5 mg mL ⁻¹)	Neutral red	50 mg
	Etanol	10 mL
Radna otopina Neutral red-a	Ishodišna otopina Neutral red-a	0,1 mL
	Hranjivi medij	9,9 mL
	Demineralizirana voda	100 mL
Otopina za odbojavanje	Etanol	98 mL
	Ledena octena kiselina	2 mL

3.2.4.2. Određivanje citotoksičnog/proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na predstavnike humane mikroflore

Korištene su bakterije u eksponencijalnoj fazi rasta, a prije početka eksperimenata, bakterijske kulture (1 mL) su se centrifugirale (3000 g, 10 minuta), nakon čega se talog isprao sa 1 mL PBS pufera i ponovno centrifugirao. Dobiveni talog sa stanicama se resuspendirao u 1 mL odgovarajuće tekuće hranjive podloge od čega je 100 µL prebačeno u mikrotitarske ploče. Slijedio je tretman s 100 µL ekstrakta dobričice različitih koncentracija (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹), a kontrola je, umjesto ekstrakta, sadržavala isti volumen odgovarajuće tekuće hranjive podloge. Slijedila je inkubacija (40 minuta, 37 °C), nakon čega su napravljena razrjeđenja koja su nacijepljena na odgovarajuće krute hranjive podloge. Broj poraslih kolonija (engl. CFU – *colony-forming unit*) mjereno je nakon kultivacije od 24 sata na 37 °C. Rezultati preživljenja bakterija nakon tretmana s različitim koncentracijama ekstrakta dobričice izračunati su prema formuli [2]:

$$\text{preživljenje bakterija} = \frac{\text{CFU/mL bakterijske suspenzije}}{\text{CFU/mL kontrole}} \cdot 100 \quad [2]$$

3.2.4.3. Određivanje prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama

Određivanje antioksidacijskog, odnosno prooksidacijskog, učinka ekstrakta dobričice u različitim koncentracijama (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) na humane stanične linije Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 provedeno je koristeći DCFH-DA metodu (Kim i Xue, 2020). U crne mikrotitarske ploče prebačeno je 100 µL suspenzije stanica (10⁵ stanica mL⁻¹), nakon čega je slijedila kultivacija (24 sata, 37 °C) u inkubatoru kontrolirane atmosfere (5 % CO₂) te



tretiranje sa 100 μL otopina različitih koncentracija ekstrakta dobričice. Kontrola je, umjesto ekstrakta, sadržavala isti volumen odgovarajućeg hranjivog medija. Tretman stanica trajao je 2 i 24 sata. Nakon završetka tretmana, slijedilo je ispiranje s PBS puferom te je u svaku jažicu dodano 100 μL radne otopine DCFH-DA, nakon čega je slijedila inkubacija (30 minuta, 37 °C). Nakon inkubacije izmjeren je intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini emisije od 485 nm i valnoj duljini ekscitacije od 530 nm. Indukcija slobodnih radikala izračunata je prema formuli [3]:

$$\text{Indukcija slobodnih radikala} = \frac{\text{intenzitet fluorescencije}_{\text{ekstrakt}} \cdot 100}{\% \text{ preživljenja} \cdot \text{intenzitet fluorescencije}_{\text{kontrola}}} \quad [3]$$

3.2.4.4. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta dobričice na modelnoj DNK i staničnom genetičkom materijalu

a) antioksidacijski/prooksidacijski učinak ekstrakta dobričice na modelnom plazmidu phi174 RF1 DNA

Superzavijeni plazmid phiX174 RF1 DNA je dvolančani kružni DNK plazmid dugačak 5386 pb, dobiven na temelju sekvence jednolančane kružne DNK prisutne u ikozahedralnom, neobavijenom kolifagu PhiX174 (Verreault i sur., 2010). Pripremljen je 1 %-tni agarozni gel u TAE puferu. TAE pufer sastojao se od Tris-HCl (48,4 g), ledene octene kiseline (11,4 mL), EDTA (3,7 g) i demineralizirane vode (do 1000 mL). Reakcijska smjesa sastojala se od 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida, 0,1 %-tne otopine vodikovog peroksida, različite koncentracije ekstrakta dobričice od 0,0125, 0,025 i 0,075 i 0,25 mg mL^{-1} te odgovarajućeg volumena TAE pufera do konačnog volumena od 30 μL . Uzorci su podvrgnuti UV zračenju kroz 16 minuta. Negativna kontrola sadržavala je 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida (NK1), dok je druga kontrola (NK2) sadržavala istu koncentraciju plazmida, ali se podvrgavala UV zračenju u trajanju od 16 minuta. Treća kontrola (NK3) sadržavala je istu koncentraciju plazmida, ali i 0,1 %-tnu otopinu vodikovog peroksida. Pozitivna kontrola (PK) sadržavala je 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plazmida, 0,1 %-tnu otopinu vodikovog peroksida i podvrgavala se UV zračenju u trajanju od 16 minuta. Nakon UV zračenja, u svaki se uzorak dodalo 3 μL obojenog pufera za nanošenje (engl. *loading buffer*) koji je sadržavao bromtimol plavo (0,2 g), glicerol (50 %-tna otopina, 6 mL) i demineraliziranu vodu (4 mL). Tako pripremljeni uzorci nanosili su se u jažice gela, a površina gela se prelila s TAE puferom. Elektroforeza je trajala 1 sat pri 150 mA, nakon čega se gel bojavao u otopini etidijevog bromida koncentracije 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kroz 15 – 20 minuta i potom izložio UV zračenju.



Fotografije gela analizirane su u programu GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com>; Lazar, I., Jr. and Lazar, I., Sr.).

b) određivanje oštećenja DNK u stanicama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 komet testom

Za ispitivanje genotoksičnog, odnosno genoprotektivnog, učinka ekstrakta dobričice korištena je metoda alkalnog komet testa (Singh i sur., 1988). Prije početka eksperimenta, iz Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 staničnih suspenzija (5 mL), uklonio se istrošeni hranjivi medij nakon čega je slijedio tretman, kroz 2 i 24 sata, sa 3 mL ekstrakta dobričice u koncentracijama od 0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹. Negativna kontrola je, umjesto ekstrakta, sadržavala isti volumen odgovarajućeg medija. Nakon tretmana, uklonio se medij s ekstraktom, stanice su se isprale s PBS puferom, tripsinizirale i prebacile u epruvete (Eppi[®]). Slijedilo je centrifugiranje (5000 rpm, 5 minuta), a zaostali talog sa stanicama koristio se za daljnje provođenje eksperimenta. Na brušena predmetna stakalca nanoseno je 300 µL otopine 1,5 %-tne agaroze normalne točke tališta (engl. *normal melting point*, NMP) te su potom na njezin polimerizirani sloj nanoseni uzorci, odnosno 10 µL resuspendiranih stanica i 100 µL 0,5 %-tne agaroze niske točke tališta (engl. *low melting point*, LMP). Nakon polimerizacije, stakalca su premazana još jednim slojem LMP agaroze (100 µL). Nakon polimerizacije zadnjeg nanosenog sloja agaroze, provodena je liza stanica u puferu za lizu (+ 4 °C). Stakalca su potom prenesena u kadu za elektroforezu napunjenu alkalnim puferom za elektroforezu. Elektroforeza se provodila pri 300 mA i 25 V kroz 20 minuta. Nakon provedene elektroforeze, stakalca su ispirana s Tris-HCl puferom (pH = 7,5). Prije analize, pripremljeni preparati bojani su otopinom etidijevog bromida (10 mg mL⁻¹) kroz 10 minuta, nakon čega je slijedilo ispiranje s Tris-HCl puferom. Mjerenja su provedena epifluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom podešenim na 515 – 560 nm, dok je za analizu slike korišten računalni program Comet Assay II. Na svakom preparatu izmjereno je po 200 kometa, a za potrebe ovog istraživanja kao pokazatelji oštećenja DNK korišteni su intenzitet repa i repni moment.

3.2.4.5. Određivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma

Albumin iz goveđeg seruma (BSA) korišten je kao modelni stanični protein za ispitivanje antioksidacijskih svojstava ekstrakta dobričice. Reakcijska smjesa sastojala se od 240 µL BSA (1 mg mL⁻¹), 60 µL otopine željezovog(III) klorida, 60 µL askorbinske kiseline, 24 µL otopine vodikovog peroksida (25 mM), odgovarajuće volumene ekstrakta dobričice s konačnim koncentracijama od 0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹ i demineraliziranu vodu do konačnog volumena od 600 µL. Pozitivna kontrola je, umjesto ekstrakta, sadržavala 125 µL Trolox-a (10 mg mL⁻¹), a negativna kontrola 125 µL metanola. Slijedila je inkubacija (30 minuta, 37 °C)



nakon čega je u reakcijsku smjesu dodano 500 μL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) te je potom ponovno slijedila inkubacija (30 minuta, sobna temperatura). U inkubacijsku smjesu je zatim dodano 500 μL 10 %-tne otopine trikloroctene kiseline te je smjesa inkubirana na ledu (15 minuta). Uzorci su centrifugirani i ispirani s 1 mL etilnog acetata, a potom resuspendirani u 500 μL gvanidin hidroklorida (6 M), nakon čega je izmjerena apsorbancija na 370 nm. Antioksidacijski kapacitet izražen je u odnosu na pozitivnu kontrolu prema formuli [4]:

$$\text{Antioksidacijski kapacitet (\%)} = \frac{A_{370} \text{ pozitivna kontrola} - A_{370} \text{ ekstrakt}}{A_{370} \text{ pozitivna kontrola}} \cdot 100 \quad [4]$$

gdje je A_{370} vrijednost apsorbancije izmjerene na 370 nm.

3.2.5. In vivo analize ekstrakta dobričice

3.2.5.1. Obrada pokusnih štakora

Korišteni su štakori soja Sprague Dawley uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska). Prije početka eksperimenta, štakori oba spola bili su podijeljeni u testne i kontrolne skupine slučajnim odabirom. Prosječna masa ženki štakora iznosila je 250 g, dok je prosječna masa mužjaka iznosila 350 g. Životinje su vagane na početku, sredini i na kraju eksperimenta. Štakori oba spola bili su stari 60 ± 5 dana. Svaka skupina sastojala se od 8 životinja. Testne skupine tretirane su liofiliziranim ekstraktom dobričice oralno-gastralnom kanilom (*per os*) koncentracijama od 250, 500 i 1000 mg kg^{-1} štakora (oznake skupina redom 250_M, 500_M i 1000_M za muške štakore i 250_Ž, 500_Ž i 1000_Ž za ženske štakore), dok su kontrolne skupine tretirane istim volumenom demineralizirane vode (oznake skupina K_M za muške štakore i K_Ž za ženske štakore). Nakon 14 dana životinje su žrtvovane, 24 sata nakon primjene zadnje doze, radi uzimanja krvi (serum) i organa (bubrezi, jetra i slezena). Organi su vagani te je izračunat postotak svakog organa na masu štakora. Organi su do daljnjih analiza čuvani na -80 °C.

3.2.5.2. Određivanje hematoloških i biokemijskih parametara krvi štakora

Analiza krvi štakora provedena je po završetku eksperimenta u medicinsko-biokemijskom laboratoriju poliklinike Breyer (Hrvatska) akreditiranom pretragom prema međunarodnoj normi HRN EN ISO 15189:2012. U svrhu određivanja hematoloških parametara, krv je sakupljena punkcijom aorte u heparizirane vakuteinere, a za analizu biokemijskih parametara krvi korišten je serum koji je izoliran na način da je epruveta puna krvi dobivena punkcijom iz



aorte stajala 30 minuta u hladnjaku na + 4 °C, sadržaj je centrifugiran (5 minuta, 2500 rpm) i izdvojen je serum. Od hematoloških parametara određeni su ukupan broj eritrocita, trombocita i leukocita, hemoglobin, MCV (prosječni volumen eritrocita), MCH (prosječna količina hemoglobina u eritrocitu), MCHC (prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima), RDW (raspodjela eritrocita po volumenu) i MPV (prosječni volumen trombocita). Analizirana je i diferencijalna krvna slika (limfociti, monociti, neutrofilni granulociti, eozinofilni granulociti i bazofilni granulociti). Od biokemijskih parametara određeni su urea, kreatinin (enzimatska metoda sljedeća do metode IDMS i standarda NIST SRM 967), bilirubin, glukoza, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), laktat dehidrogenaza (LDH) i ukupni proteini.

3.2.5.3. Priprema homogenata organa za analize

Od svakog organa (bubrezi, jetra i slezena) izuzet je dio tkiva, bez masnog tkiva, koji je izvagan te je dodan PBS pufer u omjeru 1:10 i provedeno je usitnjavanje ultrazvučnim homogenizatorom. Tijekom homogenizacije, uzorci su se hladili kako ne bi došlo do koagulacije proteina. Dobiveni homogenati su centrifugirani (15 000 rpm, 15 minuta, 4 °C), nakon čega su supernatanti otpipetirani u epruvete (Eppi®) i napravljena su prikladna razrjeđenja. Uzorci su se čuvali na -20 °C do daljnjih analiza.

3.2.5.4. Određivanje udjela proteina u homogenatima organa

Udjel proteina u homogenatima organa određen je slijedeći metodu Lowry i suradnika (1951). Reakcija smjesa sastojala se od 100 µL razrijeđenog uzorka (homogenati bubrega, jetre i slezene) i 2 mL otopine D (Tablica 16). Smjesa se inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedio dodatak 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 2:1) te inkubacija kroz 30 minuta. Apsorbancija reakcijske smjese mjerila se na 600 nm, a baždarna krivulja izrađena je koristeći albumin iz goveđeg seruma kao standard (0,02 – 2 mg mL⁻¹).

Tablica 16. Priprema otopina za određivanje proteina metodom po Lowry-u

Naziv otopine	Postupak pripreme otopina
Otopina A	2 g natrijevog karbonata u 100 mL 0,1 M otopine natrijevog hidroksida
Otopina B	0,1 g kalij natrij tartarata u 10 mL vode
Otopina C	0,05 g bakrovog sulfata pentahidrata u 10 mL vode
Otopina D	miješanje otopina A, B i C u omjeru 48:1:1



3.2.5.5. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije u organima

Intenzitet lipidne peroksidacije mjereno je određivanjem koncentracije malondialdehida tiobarbiturnim testom (engl. *tiobarbituric acid reactive substances* - TBARS) slijedeći metodu Ohkawa i suradnika (1979). Reakcijska smjesa sastojala se od 100 μL homogenata organa i 1,6 mL otopine D (Tablica 17). Uzorci su inkubirani 1 sat na 95 $^{\circ}\text{C}$, nakon čega su se hladili na ledu 10 minuta te centrifugirali (5000 rpm, 15 minuta, 4 $^{\circ}\text{C}$). Apsorbancija supernatanta mjerila se na 500 nm, a koncentracija malondialdehida (MDA) izračunala se prema formuli [5]:

$$c(\text{MDA}) = \frac{A_{\text{uzorak}} \cdot V_{\text{reakcijska smjesa}}(\text{mL})}{l \cdot \varepsilon \cdot V_{\text{uzorak}}(\text{mL}) \cdot \gamma_{\text{proteini}}(\text{mg mL}^{-1})} \quad [5]$$

gdje molarni ekstincijski koeficijent (ε) iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a duljina kivete (l) 1 cm. Koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA mg^{-1} proteina.

Tablica 17. Priprema otopina za određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Naziv otopine	Postupak pripreme otopina
Otopina A	0,81 g natrij dodecil sulfata u 10 mL demineralizirane vode
Otopina B	20 mL ledene octene kiseline i 2,31 mL klorovodične kiseline (podesiti pH otopine na 3,5) i do 100 mL demineralizirane vode
Otopina C	0,8 g tiobarbiturne kiseline u 40 mL demineralizirane vode
Otopina D	miješanje otopina A, B i C u omjeru 1:7,5:7,5

3.2.5.6. Određivanje koncentracije karboniliranih proteina u organima

Određivanje koncentracije karboniliranih proteina provedeno je slijedeći metodu Levine i suradnika (1990). Reakcijska smjesa sastojala se od 200 μL homogenata organa i 300 μL 10 mM otopine DNPH pripremljene u 2 M otopini klorovodične kiseline. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala isti volumen 2 M otopine klorovodične kiseline. Reakcijska smjesa inkubirala se 1 sat na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodano 500 μL 20 %-tne otopine trikloroctene kiseline. Uzorci su hlađeni na ledu 5 minuta i centrifugirani (12 000 rpm, 10 minuta, 4 $^{\circ}\text{C}$). Supernatant se odbacio, a talog se isprao 3 puta s 1 mL otopine etanola i etilnog acetata (1:1). U konačnici, talog se otopio u 1 mL 6 M otopine gvanidin hidroklorida, pripremljenoj u 2 M otopini klorovodične kiseline, a apsorbancija se mjerila na 370 nm. Koncentracija karboniliranih proteina (PC) izračunala se prema formuli [6]:



$$c(PC) = \frac{A_{slijepa\ proba\ (370)} - A_{uzorak(370)}}{\varepsilon \cdot \gamma_{proteini} (mg\ mL^{-1}) \cdot l} \quad [6]$$

gdje molarni ekstincijski koeficijent (ε) iznosi $22\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$, a duljina kivete (l) 1 cm. Koncentracija PC-a izražena je kao nmol proteinskih karbonila mg^{-1} proteina.

3.2.5.7. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa u organima

Koncentracija ukupnog glutationa određena je slijedeći metodu opisanu u radu Tietze (1969). Reakcijska smjesa sastojala se od 20 μL uzorka, 40 μL 0,035 M otopine klorovodične kiseline i 10 mM otopine DTNB-a, pripremljene u 0,5 M puferne otopine i 0,5 M otopine EDTA (1:1). Reakcijska smjesa inkubirana je na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 412 nm, koristeći čitač mikropločica. Nakon prvog mjerenja dodalo se 100 μL otopine pripremljene miješanjem 0,8 mM otopine NADPH i glutation reduktaze (499:1) te se mjerila apsorbancija svake minute unutar vremenskog intervala od 5 minuta na 412 nm. Ukupna koncentracija glutationa (GSH) izračunala se prema formuli [7]:

$$c(GSH) = \frac{(A_{bez\ enzima} - A_{s\ enzimom}) \cdot V_{reakcijske\ smjese} (mL) \cdot d}{\varepsilon \cdot V_{uzorka} (mL) \cdot c_{proteina} (mg \cdot mL^{-1})} \quad [7]$$

gdje molarni ekstincijski koeficijent (ε) DTNB-a iznosi $8,22\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$, a d predstavlja faktor razrjeđenja uzorka. Koncentracija ukupnog glutationa izražena je kao mU mg^{-1} proteina.

3.2.5.8. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze u organima

Aktivnost superoksid dismutaze određena je koristeći komercijalno dostupan set proizvođača Cayman Chemical (item no. 706002) s potrebnim kemikalijama i uputama. Reakcijska smjesa sastojala se od 200 μL detektora radikala (otopina tetrazolijeve soli), 10 μL uzorka i 20 μL ksantin oksidaze. Uzorci i kemikalije razrijeđeni su u odgovarajućem puferu prema uputama proizvođača. Reakcijska smjesa inkubirala se 30 minuta na sobnoj temperaturi uz stalno lagano miješanje. Apsorbancija se mjerila na 450 nm koristeći čitač mikropločica. Baždarna krivulja izrađena je koristeći superoksid dismutazu iz goveđih eritrocita, a rezultati su izraženi kao U mL^{-1} homogenata organa.

3.2.5.9. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka ekstrakta dobričice na organima i krvi

Za ispitivanje genotoksičnog, odnosno genoprotektivnog, učinka ekstrakta dobričice korištena je metoda alkalnog komet testa (Singh i sur., 1988), uz određene modifikacije (Sasaki i sur.,



1997). Otopina 1 %-tne agaroze stavljena je na brušeno predmetno stakalce u svrhu polimerizacije, nakon čega je gel uklonjen sa stakalca i otpipetirano je 300 μL 0,6 %-tne otopine NMP agaroze. Nakon njene polimerizacije, otpipetirano je 100 μL 0,5 %-tne otopine LMP agaroze i 5 μL uzorka. Nakon 10 minuta, sloj je prekriven sa 100 μL 0,5 %-tne otopine LMP agaroze, nakon čega je slijedila polimerizacija. Uzorci su uronjeni u pufer za lizu (pH = 10; 2,5 M natrijev klorid, 1 % natrijev laurilsarkozinat, 10 mM Tris-HCl, 100 mM Na₂EDTA, 1 % Triton X-100 i 10 % dimetil sulfoksid) kroz 1 sat na + 4 °C, a potom prebačeni u pufer za denaturaciju (pH = 13; 0,3 M natrijev hidroksid i 1 mM Na₂EDTA) na 20 minuta. Elektroforeza je provedena pri 300 mA i 25 V kroz 20 minuta. Pri završetku elektroforeze, preparati su isprani pomoću neutralizacijskog pufera (pH = 7,5; 0,4 M Tris-HCl) i obojani sa 100 μL etidijevog bromida (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Mjerenja su provedena epifluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom podešenim na 515 – 560 nm, dok je za analizu slike korišten računalni program Comet Assay II. Na svakom preparatu izmjereno je po 200 kometa, a za potrebe ovog istraživanja kao pokazatelji oštećenja DNK korišteni su parametri dužine i intenziteta repa.

3.2.6. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem

3.2.6.1. Provođenje termalnih analiza polimera

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry* – DSC) provedena je za šest polimera, koji su korišteni kao nosači za inkapsulaciju ekstrakta dobričice sušenjem raspršivanjem, na uređaju Mettler Toledo DSC 823^e. Svaki uzorak (2 – 4 mg) zatvoren je unutar predviđene aluminijske posudice za mjerenje. Analiza uzorka unutar uređaja obuhvaćala je hlađenje na -70 °C i zatim zagrijavanje brzinom od 10 °C min⁻¹ u temperaturnom području od -70 °C do 250 °C uz inertnu struju dušika pri protoku od 50 mL min⁻¹. Rezultati su prikazani u obliku DSC termograma.

Termogravimetrijska analiza (engl. *thermogravimetric analysis* – TGA) provedena je za polimere na uređaju TA Instruments Q500. Mjerenja su obavljena u atmosferi zraka pri brzini protoka od 60 mL min⁻¹. Masa uzoraka bila je oko 5 mg, a brzina zagrijavanja 10 °C min⁻¹ u temperaturnom području od 25 °C do 350 °C.

3.2.6.2. Priprema otopina nosača u ekstraktu

Otopine nosača za sušenje raspršivanjem pripravljene su otapanjem različitih polimera u koncentriranom ekstraktu dobričice (*poglavlje 3.2.3.*). Pripremljeni ekstrakt dobričice koncentriran je pod vakuumom do 10 x manjeg volumen i kao takav korišten za pripremu otopina nosača (4 % (w/w) polimera). Koncentrirani ekstrakt sadržavao je 1 % suhe tvari te je



u konačnici ukupna suha tvar otopine nosača iznosila 5 %. Ukupno je pripremljeno 6 otopina pri čemu je kontrolna otopina sadržavala 4 % (w/w) djelomično hidrolizirane guar gume (uzorak DHGG), dok je u preostalih 5 otopina 25 % guar gume zamijenjeno s drugim polimerima: hidrolizirani kolagen (uzorak DHGG_HK), karboksimetil celuloza (uzorak DHGG_KMC), nutrioza (uzorak DHGG_NUT), mucin (uzorak DHGG_MUC) i ksilan (uzorak DHGG_KSI). Uzorci su miješani na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja.

3.2.6.3. Određivanje viskoznosti otopina nosača

Viskoznost otopina nosača u ekstraktu dobričice određena je pri brzinama smicanja od 10 s^{-1} do 100 s^{-1} rotacijskim testom na modularno kompaktnom reometru i korištenjem mjernog stošca CP50-1 nagiba 1° i promjera 50 mm. Razmak od donje mjerne ploče bio je postavljen na 0,102 mm. Uzorci su ekvilibrirani 3 minute na 25°C prije početka svakog mjerenja.

3.2.6.4. Provođenje sušenja raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem otopina nosača u ekstraktu dobričice provedeno je na uređaju Büchi B-290 s mlaznicom promjera 0,7 mm. Radni uvjeti uređaja postavljeni su kako slijedi: ulazna temperatura zraka $150 \pm 2^\circ\text{C}$, volumni protok medija za sušenje $35 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (100 %), volumni protok otopine 2 mL min^{-1} (8 %), volumni protok zraka za raspršivanje $600 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$ i pad tlaka mlaznice 55 kPa. Uzorci su prikupljeni u čvrste staklene posude i čuvani na $+4^\circ\text{C}$ do daljnjih analiza.

3.2.6.5. Određivanje prinosa sušenja raspršivanjem

Prinos sušenja raspršivanjem izračunao se prema formuli [8]:

$$\text{Prinos (\%)} = \frac{\text{masa praha dobivenog sušenjem raspršivanjem (g)}}{\text{masa suhe tvari otopine nosača u ekstraktu (g)}} \cdot 100 \quad [8]$$

3.2.6.6. Određivanje suhe tvari inkapsulata

Udjel suhe tvari inkapsulata određen je prema modificiranoj AOAC 930.15 metodi (Padmore, 1990a) sušenjem uzoraka do konstante mase pri 105°C .

3.2.6.7. Određivanje močivosti inkapsulata

Močivost inkapsulata provedena je prema metodi opisanoj u radu Jinapong i suradnika (2008). U laboratorijsku čašu od 250 mL dodalo se 100 mL demineralizirane vode i zatim 0,1 g inkapsulata. Močivost predstavlja vrijeme, u sekundama, koje je potrebno da sav prah postane mokar, odnosno, kada sve čestice inkapsulata prodru površinu vode.



3.2.6.8. Određivanje kontaktnog kuta vode inkapsulata

Kontaktni kut vode inkapsulata određen je metodom položene kapi na goniometru. U tu svrhu 100 mg uzorka isprešano je u pastilu koja je podvrgnuta mjerenju.

3.2.6.9. Određivanje nasipne gustoće inkapsulata

Nasipna gustoća inkapsulata određena je plinskim piknometrom. U svrhu određivanja svojstava tečnosti i kohezivnosti korišten je vibracioni volumetar pri čemu se promjena volumena očitavala nakon 0 (slobodna nasipna gustoća) i 1250 (vibraciona nasipna gustoća) udaraca što se koristilo za izračunavanje Carrovog indeksa (CI), koji predstavlja svojstvo tečnosti (Carr, 1965), i Hausnerovog omjera (HR), kao svojstva kohezivnosti (Hausner, 1967), prema formulama [9] i [10].

$$CI = \frac{\rho_{vibraciona} - \rho_{slobodna}}{\rho_{slobodna}} \cdot 100 \quad [9]$$

$$HR = \frac{\rho_{vibraciona}}{\rho_{slobodna}} \quad [10]$$

3.2.6.10. Analiza inkapsulata pretražnom elektronskom mikroskopijom

Morfološke karakteristike i veličina inkapsulata ($n = 100$) određeni su pretražnom elektronskom mikroskopijom (engl. *scanning electron microscope* – SEM). Uzorci su se pričvrstili na podlogu pomoću dvostrane ljepljive vrpce, obložili slojem zlata (5 nm) i ispitivali koristeći napon ubrzanja od 4,0 kV i uvećanje od oko 600 x.

3.2.6.11. Određivanje zeta potencijala inkapsulata

Zeta potencijal inkapsulata odredio se koristeći uređaj Malvern Zetasizer Ultra. Inkapsulati su prije mjerenja suspendirani u metanolu (pH = 6,8), nakon čega su se uronili u ultrazvučnu kupelj na 15 sekundi i prebacili u odgovarajuće kivete (DTS1070; Malvern, UK) te analizirali.

3.2.6.12. Analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Furierovom transformacijom (FT-IR)

Infracrveni spektri ekstrakta dobričice, polimera i inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem snimljeni su kao KBr pastile. Za mjerenje, 1 mg uzorka pomiješan je sa spektroskopskim kalijevim bromidom (200 mg) i isprešan u obliku pastile. Spektri su snimljeni u prosjeku od 32 skeniranja od 4000 do 400 cm^{-1} s rezolucijom od 4 cm^{-1} .



3.2.6.13. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti polifenolnih spojeva

U svrhu dobivanja podataka o inkapsulacijskoj učinkovitosti polifenolnih spojeva određen je udjel ukupnih polifenola (Singleton i Rossi, 1965) i hidroksicimetnih kiselina (Matkowski i sur., 2008) primjenom spektrofotometrijskih metoda te udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva koristeći HPLC-PDA metodologiju (*poglavlje 3.2.2.5.*). Inkapsulacijska učinkovitost određena je otapanjem 1 g inkapsulata u 5 mL demineralizirane vode na magnetskoj miješalici. Inkapsulacijska učinkovitost izračunata je kao omjer udjela istraživanih spojeva u „razbijenim“ česticama inkapsulata te u otopini nosača i ekstrakta dobričice prije inkapsulacije.

3.2.6.14. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave

Profili otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina iz inkapsulata u uvjetima simulirane probave određeni su pomoću želučane (engl. *simulated gastric fluid* – SGF) i intestinalne (engl. *simulated intestinal fluid* – SIF) otopine. Otopina SGF-a (pH = 3) sastojala se od pepsina, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogen karbonata, natrijevog klorida, magnezijevog klorida heksahidrata i amonijevog karbonata, dok se otopina SIF-a (pH = 7) sastojala od pankreatina, žučnih soli, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogen karbonata, natrijevog klorida te magnezijevog klorida heksahidrata, u koncentracijama koje su predložili Minekus i suradnici (2014). 0,5 g inkapsuliranog ekstrakta dodano je u 70 mL otopine SGF-a, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici pri 37 °C. U odgovarajućim vremenskim intervalima iz otopine je uzorkovano 1,5 mL alikvota do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 sata. Zatim su inkapsulati prebačeni u 70 mL otopine SIF-a pri istim uvjetima. Postupak uzorkovanja alikvota u definiranim vremenskim intervalima ponovljen je na prethodno opisani način. Alikvotima je određen udjel ukupnih polifenola (Singleton i Rossi, 1965) i hidroksicimetnih kiselina (Matkowski i sur., 2008), izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu inkapsulata, odnosno mg kafeinske kiseline po gramu inkapsulata.

3.2.7. Liposomalna inkapsulacija

Liposomalna inkapsulacija provedena je slijedeći metodu Perrett i suradnika (1991). U Erlenmayerovoj tikvici otopila se jednaka masa (1 g) Phospholipona 90 G i etanola uz miješanje i grijanje u vodenoj kupelji na 60 °C kroz 1 minutu nakon čega je slijedilo hlađenje u mraku i na sobnoj temperaturi (2 minute). Slijedio je dodatak 50 mg liofiliziranog ekstrakta dobričice (*poglavlje 3.2.3.*) otopljenog u 2 mL demineralizirane vode te ponovno grijanje na 60 °C kroz 2 minute uz miješanje i potom hlađenje. Pomoću peristaltičke pumpe, u Erlenmayerovu tikvicu



dodala se demineralizirana voda (48 mL) uz protok 15 mL h⁻¹ i konstantno miješanje. Pripremljeni su i prazni liposomi na isti način, bez dodatka liofiliziranog ekstrakta dobričice.

3.2.7.1. Određivanje fizikalnih parametara liposoma

Formuliranim liposomima određeni su veličina i indeks polidisperzije na principu dinamičkog raspršenja svjetlosti te zeta potencijal na principu elektroforetskog raspršenja svjetlosti na uređaju Malvern Nano-ZS Zetasizer.

3.2.7.2. Određivanje morfoloških karakteristika liposoma

AFM (engl. *atomic force microscopy* – AFM) mikroskopija rađena je na Multimode Scanning Probe Microscope uređaju s Nanoscope IIIa kontrolnom jedinicom uz skener s maksimalnim lateralnim rasponom od 125 μm. Slike praznih liposoma i liposoma s inkapsuliranim ekstraktom snimljene su u tapkajućem režimu rada pomoću silikonskih pretražnih proba (TESP-V2, nominalna rezonantna frekvencija 320 kHz, nominalna konstanta opruge 42 N m⁻¹, radijus zakrivljenosti šiljka 7 nm; Bruker, SAD). Kako bi se izbjegla eventualna oštećenja uzorka tijekom mjerenja, primijenjena sila je održavana na najnižoj vrijednosti. Brzina skeniranja optimirana je između 1,0 do 2,0 Hz po liniji. Slika je obrađena i analizirana NanoScope Analysis softwerom (ver. 2.0; Bruker, SAD). Sve slike predstavljaju originalne podatke, osim što je korištena opcija dvodimenzijskog poravnavanja prvog reda kako bi se uklonio prividni nagib površine. U svrhu AFM mikroskopije, formulirani liposomi razrijeđeni su ultračistom vodom te je volumen od 5 μL izravno otpipetiran na svježe cijepani tinjac. Listovi tinjca stavljeni su u zatvorene Petrijeve zdjelice na 30 minuta kako bi se omogućilo isparavanje otapala, a nakon toga je provedeno AFM snimanje.

3.2.7.3. Analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Furierovom transformacijom (FT-IR)

Infracrveni spektri liofiliziranog ekstrakta dobričice, praznih liposoma i liposoma s inkapsuliranim ekstraktom snimljeni su tehnikom atenuirane totalne refleksije u rasponu od 4000 do 400 cm⁻¹. Uzorci su se za potrebe analize prethodno razrijedili demineraliziranom vodom.

3.2.7.4. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti

U epruvetu (Eppi®) je dodan 1 mL pripremljene liposomalne suspenzije koja se potom centrifugirala (9500 rpm, 45 minuta, 4 °C), nakon čega je supernatant izdvojen u posebnu epruvetu za analizu, a preostali talog liposoma ispran sa 1 mL demineralizirane vode i ponovno centrifugiran (9500 rpm, 45 minuta, 4 °C). Supernatant je odbačen, a preostali talog liposoma



je suspendiran u 1 mL demineralizirane vode i prebačen u epruvetu s navojnim čepom. U istu epruvetu dodan je 1 mL metanola i 1 mL kloroforma te je sadržaj epruvete vorteksiran (1 minuta). Odvajanje faza ubrzalo se kratkim centrifugiranjem nakon čega je gornja vodeno-metanolna faza, koja sadrži inkapsulirane polifenole, prebačena u epruvetu (Eppi®) i korištena za analizu. Inkapsulacijska učinkovitost definirana je određivanjem udjela ukupnih polifenola (Singleton i Rossi, 1965), hidroksicmetnih kiselina (Matkowski i sur., 2008) i pojedinačnih polifenolnih spojeva (poglavlje 3.2.2.5.), kao omjer njihove masene koncentracije određene u izdvojenoj vodeno-metanolnoj fazi i zbroja udjela iste koncentracije i udjela određenog u prvom izdvojenom supernatantu.

3.2.7.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta TBARS metodom

Peroksidacija praznih liposoma i liposoma s inkapsuliranim ekstraktom praćena je određivanjem koncentracije malondialdehida tiobarbiturnim testom (engl. *tiobarbituric acid reactive substances* – TBARS). Prazni liposomi i liposomi s inkapsuliranim ekstraktom bili su podvrgnuti djelovanju pulsirajućeg UV zračenja s energijom zračenja po impulsu $1,27 \text{ J cm}^{-2}$. Za vrijeme tretmana iz uzorka je izuziman alikvot od 500 μL nakon 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 i 200 pulseva UV zračenja. U staklene epruvete s navojnim čepom dodano je 0,2 mL izuzetog alikvota uzorka liposoma, 3 mL 20 %-tne trikloroctene kiseline i 1 mL stock otopine koja je sadržavala isti volumen 2 %-tne tiobarbiturne kiseline i 20 %-tne perklorne kiseline. Reakcijska smjesa je vorteksirana i stavljena u vodenu kupelj ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) kroz 25 minuta. Reakcija je zaustavljena stavljanjem epruveta u hladnu vodu na 5 minuta. Kako bi se uklonio nastali precipitat, uzorci su centrifugirani (9500 rpm, 10 minuta) i izmjerena je apsorbancija supernatanta na 532 nm.

3.2.7.6. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave

Simulirana probava inkapsulata u želucu (SGF – *simulated gastric fluid*) i tankom crijevu (SIF – *simulated intestinal fluid*) provedena je slijedeći metodu Minekus i suradnika (2014), odnosno, na isti način kao i za inkapsulate dobričice dobivene sušenjem raspršivanjem (poglavlje 3.2.6.14.). Profil otpuštanja praćen je određivanjem ružmarinske kiseline HPLC-PDA metodologijom (poglavlje 3.2.2.5.)

3.2.8. In vivo analize inkapsulata dobričice

Za *in vivo* istraživanje bioloških učinaka ekstrakta dobričice u inkapsuliranom obliku odabrani su liposomalni inkapsulati zbog izrazito visoke inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih



polifenola i ružmarinske kiseline te kontroliranog i kontinuiranog otpuštanja ružmarinske kiseline tijekom simulirane probave (*poglavlje 4.8.3.*).

3.2.8.1. Obrada pokusnih štakora

Korišteni su štakori soja Wistar uzgojeni na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (Hrvatska). Prije početka eksperimenta, štakori oba spola bili su podijeljeni u testne i kontrolne skupine slučajnim odabirom. Svaka skupina sastojala se od 8 životinja. Prosječna masa ženki štakora iznosila je 200 g, dok je prosječna masa mužjaka iznosila 350 g. Testne skupine tretirane su liposomalnim inkapsulatom dobričice oralno-gastralnom kanilom (*per os*) u koncentraciji od 250 mg inkapsuliranog ekstrakta po kg štakora (oznaka skupine E_M za muške štakore i E_Ž za ženske štakore). Prva kontrolna skupina tretirana je istim volumenom praznih liposoma (oznaka skupine L_M za muške štakore i L_Ž za ženske štakore), a druga kontrolna skupina istim volumenom demineralizirane vode (oznaka skupine V_M za muške štakore i V_Ž za ženske štakore). Nakon 14 dana životinje su žrtvovane radi uzimanja organa (bubrezi, jetra i slezena). Organi su do daljnjih analiza čuvani na -80 °C.

3.2.8.2. Određivanje parametara oksidacijskog stresa

Homogenati organa pripremljeni su na način opisan u *poglavlju 3.2.5.3.* U homogenatima tkiva određeni su udjel proteina (*poglavlje 3.2.5.4.*), intenzitet lipidne peroksidacije (*poglavlje 3.2.5.5.*), koncentracija karboniliranih proteina (*poglavlje 3.2.5.6.*), koncentracija ukupnog glutationa (*poglavlje 3.2.5.7.*), aktivnost superoksid dismutaze (*poglavlje 3.2.5.8.*) i antioksidacijski kapacitet ABTS metodom (*poglavlje 3.2.2.4.*).

3.2.9. Formulacija čokolada uz inkorporaciju inkapsulata dobričice

Proizvodnja čokolada provedena je miješanjem svih sastojaka u melanžeru kroz 2 sata. Kakaova masa i kakaov maslac su prije stavljanja u zamjes za čokoladnu masu zagrijani na 50 °C te u tekućem obliku stavljeni u melanžer. Nakon miješanja u melanžeru, dobivena čokoladna masa ručno je temperirana – čokoladna masa zagrijala se na 45 – 50 °C, potom se hladila do 28 °C i ponovno zagrijala na 32 °C, uz konstantno miješanje, a na kraju lijevala u kalupe. U formulacije funkcionalnih čokolada dodani su inkapsulati dobričice dobiveni sušenjem raspršivanjem (uzorak DHGG_MUC zbog najviše vrijednosti inkapsulacijske učinkovitosti za ružmarinsku kiselinu – *poglavlje 4.7.5.*) i liposomalni inkapsulati dobričice. Pripremljeno je 5 formulacija čokolada. Kontrolni uzorak (uzorak Č_K) pripremljen je bez dodatka inkapsulata, odnosno sadržavao je kakaovu masu (40,5 %), kakaov maslac (25 %), šećer u prahu (33 %) i suncokretov lecitin (1,5 %). Pripremljena su dva uzorka čokolade s inkapsulatom dobričice



pripremljenim sušenjem raspršivanjem - prva formulacija (uzorak Č_SR1) uključivala je dodatak inkapsulata u čokoladnu masu u melanžer zadnjih pola sata miješanja u udjelu od 2 % u odnosu na čokoladnu masu, dok je druga formulacija (uzorak Č_SR2) uključivala dodatak i homogenizaciju inkapsulata u kakaov maslac (u udjelu od 10 % na kakaov maslac) te potom dodatak obogaćenog kakaovog maslaca s inkapsulatom u zamjes za čokoladnu masu (Slika 26). Također su pripremljena dva uzorka čokolade s liposomalnim inkapsulatom dobričice – liposomalni inkapsulat se u prvoj formulaciji (uzorak Č_L1) dodao u čokoladnu masu u melanžer zadnjih pola sata miješanja u udjelu od 4 % na čokoladnu masu, a druga formulacija (uzorak Č_L2) uključivala je dodatak i homogenizaciju liposomalnog inkapsulata u kakaov maslac (u udjelu od 20 % na kakaov maslac) te potom dodatak obogaćenog kakaovog maslaca s liposomima u zamjes za čokoladnu masu (Slika 26).

Sastojci	Kontrolni uzorak čokolade	Čokolade s dodatkom inkapsulata dobivenog sušenjem raspršivanjem		Čokolade s dodatkom liposomalnog inkapsulata	
Kakaova masa	40,5 %	40,5 %	40,5 %	40,5 %	40,5 %
Kakaov maslac	25 %	25 %	/	25 %	/
Obogaćeni kakaov maslac	/	/	25 % (10 % inkapsulata)	/	25 % (20 % inkapsulata)
Šećer u prahu	33 %	33 %	33 %	33 %	33 %
Lecitin	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %
Inkapsulati	/	2 %	/	4 %	/

MIJEŠANJE U MELANŽERU



Oznake uzoraka	Č_K	Č_SR1	Č_SR2	Č_L1	Č_L2
----------------	-----	-------	-------	------	------

Slika 26. Recepture novoformuliranih čokolada



3.2.9.1. Određivanje udjela čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu

Udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu (KM), kakaovom maslacu s dodatkom inkapsulata dobričice dobivenog sušenjem raspršivanjem (KM_SR) i kakaovom maslacu s dodatkom liposomalnog inkapsulata dobričice (KM_L) određen je NMR (nuklearna magnetska rezonancija) metodom. Uzorci za analizu pripremljeni su prema metodi ISO 8292-1 (2008) – temperiranje na 60 °C kroz 15 minuta, zatim na 0 °C kroz 90 minuta, zatim na 26 °C kroz 40 sati, ponovno na 0 °C kroz 90 minuta te u konačnici zagrijavanje na 60 °C kroz 30 minuta nakon čega su uzorci podvrgnuti mjerenju na NMR uređaju.

3.2.9.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada

Novoformulirane čokolade (3 g) prebačene su u reagens boce i grijane na 70 °C kroz 10 minuta u vodenoj kupelji. Zatim je u boce dodana vruća voda zagrijana do vrenja (10 mL) nakon čega se provodilo miješanje na magnetskoj miješalici kroz 15 minuta. Potom je u iste boce dodan metanol (10 mL) te su uzorci ponovno miješani 15 min na magnetskoj miješalici nakon čega su prebačeni u ultrazvučnu kupelj grijanu na 50 °C kroz 15 minuta. Po završetku ekstrakcija, uzorci su ohlađeni i centrifugirani (9500 rpm, 20 minuta). Supernatanti su podvrgnuti analizi pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina koristeći HPLC-PDA metodologiju (poglavlje 3.2.2.5.).

3.2.9.3. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave

Simulirana probava čokolada je, uz želučanu fazu (SGF – *simulated gastric fluid*) i intestinalnu fazu (SIF – *simulated intestinal fluid*) (poglavlje 3.2.6.14.), uključivala i oralnu fazu (SSF – *simulated salivary fluid*) prema protokolu opisanom u radu Minekus i suradnika (2014). SSF se sastojao od salivarne α -amilaze, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogen karbonata, magnezijevog klorida heksahidrata i amonijevog karbonata. Profil otpuštanja praćen je određivanjem udjela ružmarinske kiseline koristeći HPLC-PDA metodologiju (poglavlje 3.2.2.5.).

3.2.9.4. Određivanje reoloških svojstva čokolada

Reološka svojstva čokolada provedena su slijedeći metodu IOCCC (2000) i koristeći Casson-ov model. Temperatura tijekom mjerenja bila je 40 °C, a prije početka analize na čokolade je primijenjena brzina smicanja od 5 s⁻¹ tijekom 5 minuta. Tijekom analize, brzina smicanja povećavala se od 2 do 50 s⁻¹ tijekom 3 minute, nakon čega je održavana brzina smicanja od 50 s⁻¹ tijekom 1 minute te se brzina smicanja smanjivala od 50 do 2 s⁻¹ tijekom 3 minute. Rezultati su analizirani u programu RheoCompass (Anton Paar, Austrija).



3.2.9.5. Određivanje svojstva taljenja čokolada

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) provedena je na uređaju Mettler Toledo DSC 823^o prema metodi opisanoj u radu Dolatowska-Żebrowska i suradnika (2019). Svaki uzorak (oko 4 mg) zatvoren je unutar predviđene aluminijske posudice za mjerenje. Analiza uzorka unutar uređaja obuhvaćala je hlađenje na 10 °C i zatim zagrijavanje brzinom od 4 °C min⁻¹ u temperaturnom području od 10 °C do 50 °C uz inertnu struju dušika pri protoku od 50 mL min⁻¹. Rezultati su prikazani u obliku DSC termograma iz kojih su iščitane vrijednosti za maksimalnu temperaturu taljenja (T_i) i entalpiju taljenja (ΔH_i) za oblik V (β_2) kakaovog maslaca u uzorcima čokolada.

3.2.9.6. Određivanje teksturalnih svojstva čokolada

Uzorci čokolada bili su podvrgnuti analizi tvrdoće na uređaju za ispitivanje teksture TA.HD.plus koristeći metodu opisanu u radu Nightingale i suradnika (2011). Uzorci su bili dimenzija 3 cm x 2,5 cm x 1 cm (dužina x širina x visina) i prije analize su bili temperirani na sobnu temperaturu.

3.2.9.7. Senzorska analiza čokolada

Senzorska analiza čokolada provedena je prema metodi ISO 8589:2007. Senzorsku analizu provodio je interni panel Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska) koji se sastojao od 20 članova starosti između 20 i 50 godina. Članovi panela imali su prethodnog iskustva u ocjenjivanju čokoladnih proizvoda i bili su podvrgnuti senzorskim treninzima. Čokolade su servirane članovima panela na sobnoj temperaturi, a ocjenjivani su parametri izgleda (boja, sjaj i površina), akustičnosti (lom), teksture (taljenje) te okusa (slatko, gorko i biljno) koristeći ljestvicu procjene jačine ocjenama od 1 do 9 (pri čemu 1 označava izrazito nizak intenzitet/jačinu parametra, a 9 izrazito visoki intenzitet/jačinu parametra). Opća prihvatljivost čokolada ocjenjivana je hedonističkom skalom od 1 do 9, pri čemu 1 izražava izrazito nepoželjan proizvod, a 9 izrazito poželjan proizvod.

3.2.10. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata provedena je u programu Statistica (v.14, TIBCO Software Inc.). Korištena je deskriptivna statistika uključujući određivanje standardne devijacije, medijana i standardne pogreške. Koristili su se jednosmjerni ANOVA test, Tukey *post-hoc* test, Studentov t-test, Kruskal-Wallis test ili Mann-Whitney U test, ovisno o normalnosti distribucije eksperimentalnih podataka. Uz rezultate su navedeni statistički testovi korišteni u njihovoj obradi.



4. Rezultati

4.1. Karakterizacija kemijskog sastava dobričice

Rezultati određivanja kemijskog sastava uzoraka dobričice, prikupljenih s različitih lokacija (uzorci D1 – D7), uključujući udjel suhe tvari, proteina, ulja, pepela, prehrambenih vlakana velike molekulske mase te sastav masnih kiselina ulja prikazani su u Tablici 18. Udjeli pojedinih komponenti kemijskog sastava dobričice izraženi su na suhu tvar uzorka. Netopljiva prehrambena vlakna velike molekulske mase s udjelom u rasponu od 32,26 % s. tv. (uzorak D1) do 48,03 % s. tv. (uzorak D4) činila su najveći dio suhe tvari svih uzoraka dobričice, dok su topljiva prehrambena vlakna velike molekulske mase bila zastupljena u znatnom manjom udjelu – od 4,97 % s. tv. (uzorak D5) do 9,14 % s. tv. (uzorak D7). Nadalje, utvrđeno je da svi uzorci dobričice obiluju proteinima, naročito uzorak D5 čiji je udjel proteina u suhoj tvari iznosio 23,12 %. Vrijednosti udjela pepela uzoraka dobričice nalazile su se u uskom rasponu od 9,20 % s. tv. (uzorak D6) do 10,98 % s. tv. (uzorak D3). Najmanje zastupljena makrokomponenta u svim uzorcima dobričice bilo je ulje čiji udjel nije prelazio 2,80 % s. tv. (uzorak D1). Profil zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina razlikovao se ovisno o prirodnom staništu biljke, no, u svim uzorcima dobričice dominirale su nezasićene masne kiseline u odnosu na zasićene, s oleinskom kiselinom (33,85 i 39,01 % m.k. u uzorcima D2 i D4), linolnom kiselinom (19,48 i 32,35 % m.k. u uzorcima D3 i D6) i α -linolenskom kiselinom (29,45, 37,92 i 27,15 % m.k. u uzorcima D1, D5 i D7) kao najzastupljenijima. Među zasićenim masnim kiselinama, palmitinska kiselina u rasponu od 7,14 % m.k. (uzorak D4), do 13,33 % m.k. (uzorak D3), bila je najzastupljenija, osim u uzorku D7, gdje je kao najzastupljenija zasićena masna kiselina određena lignocerinska kiselina (13,73 % m.k.).

Udjel makro- i mikroelemenata uzoraka dobričice (uzorci D1 – D7) prikazan je u Tablici 19. Najzastupljeniji makroelementi u svim uzorcima dobričice bili su kalij (K) i kalcij (Ca) u rasponu udjela od 14,49 mg g⁻¹ s. tv. (uzorak D1) do 29,80 mg g⁻¹ s. tv. (uzorak D4), odnosno, od 7,78 mg g⁻¹ s. tv (uzorak D2) do 14,89 mg g⁻¹ s. tv (uzorak D3). Nadalje, za većinu uzoraka (uzorci D3, D4, D5, D6 i D7), udjel makroelemenata smanjivao se sljedećim redom: K > Ca > Mg > P > Al > Fe > Na, s time da je u uzorku D1 detektirano više Al u odnosu na P, a u uzorku D2 više P u odnosu na Mg. Od istraživanih mikroelemenata po udjelu istaknuli su se vanadij (V) i krom (Cr), posebice u uzorcima D1 (3380 i 3294 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. tv.) i D2 (3793 i 2873 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. tv.).



Tablica 18. Osnovni kemijski sastav uzoraka dobričice

Uzorak	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Suha tvar (%)	91,13±0,10 ^{abc}	91,86±0,06	90,96±0,03 ^a	91,33±0,14 ^{bde}	91,27±0,05 ^{cdf}	91,45±0,01 ^{ef}	93,15±0,12
Udjel proteina (% s. tv.)	15,63±0,13 ^{abc}	14,75±0,23 ^d	15,61±0,20 ^{adef}	17,74±0,17	23,12±0,33	15,86±0,27 ^{beg}	16,16±0,16 ^{efg}
Udjel ulja (% s. tv.)	2,80±0,54 ^{abcde}	2,05±0,07 ^{afghij}	1,10±0,20 ^{fk}	2,63±0,71 ^{bglnm}	1,86±0,15 ^{chklop}	2,39±0,10 ^{dimor}	2,30±0,06 ^{ejmpr}
Miristinska kiselina, C14:0 (% m.k.)	0,18±0,02 ^a	nd	4,53±0,48	0,18±0,05 ^a	nd	nd	1,25±0,03
Palmitinska kiselina, C16:0 (% m.k.)	7,47±0,09 ^{abc}	7,70±0,23 ^{adef}	13,33±2,28 ^g	7,14±0,14 ^{bhd}	10,24±0,82 ^{ej}	11,68±0,86 ^{gi}	7,68±0,42 ^{efhj}
Palmitoleinska kiselina, C16:1 (% m.k.)	0,93±0,03	nd	nd	0,14±0,01	nd	nd	1,07±0,03
Heptadekanska kiselina, C17:0 (% m.k.)	0,19±0,01	nd	nd	0,07±0,01	nd	nd	0,39±0,02
Stearinska kiselina, C18:0 (% m.k.)	2,28±0,50 ^{ab}	4,40±1,25 ^c	15,46±0,50 ^d	1,59±0,00 ^{ae}	16,33±0,30 ^d	5,89±0,05 ^c	1,88±0,05 ^{be}
Oleinska kiselina, C18:1 (% m.k.)	28,88±0,31	33,85±1,76	18,19±0,81	39,01±0,10	nd	21,64±0,03	8,70±0,41
Linolna kiselina, C18:2 (% m.k.)	24,51±0,12 ^a	22,63±0,22 ^b	19,48±0,44	21,71±0,50 ^b	24,95±0,50 ^a	32,35±0,43	14,92±0,29
α -linolenska kiselina, C18:3n3 (% m.k.)	29,45±0,14	24,13±0,81	18,25±0,55	20,27±0,51 ^a	37,92±1,44	21,96±0,14 ^a	27,15±0,38
Arahidonska kiselina, C20:0 (% m.k.)	0,34±0,16 ^a	nd	nd	0,25±0,01 ^a	nd	2,15±0,13	0,63±0,04
Behenska kiselina, C22:0 (% m.k.)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,52±0,19
Lignocerinska kiselina, C24:0 (% m.k.)	2,46±0,13	nd	nd	3,22±0,42	nd	nd	13,73±0,21
Udjel pepela (% s.tv.)	9,76±0,09 ^{abcd}	9,59±0,10 ^{aefg}	10,98±0,44 ^h	10,95±0,23 ^h	10,02±0,13 ^{bei}	9,20±0,02 ^{cf}	9,97±0,40 ^{dgi}
Udjel prehrambenih vlakana (% s. tv.)	37,74±2,11 ^a	43,14±1,15 ^{bcd}	46,65±1,19 ^{bef}	55,23±3,42	41,44±0,65 ^{acg}	44,05±1,08 ^{deg}	49,76±1,10 ^f
• Netopljiva prehrambena vlakna (% s. tv.)	32,26±0,55 ^a	34,14±0,65 ^a	41,50±0,82 ^b	48,03±0,18	36,47±0,82 ^c	37,03±1,15 ^c	40,61±0,85 ^b
• Topljiva prehrambena vlakna (% s. tv.)	5,48±0,74 ^{abc}	9,00±0,89 ^d	5,15±0,43 ^{ae}	7,19±0,72 ^f	4,97±0,38 ^{be}	7,02±0,40 ^{cf}	9,14±0,26 ^d

s.tv.-suha tvar; m.k.-masne kiseline; nd-nije detektirano. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti u istom retku označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.



Tablica 19. Udjel makro- i mikroelemenata u uzorcima dobrica

Uzorak	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
<i>Makroelementi (mg kg⁻¹ s. tv.)</i>							
Na	58±2 ^{ab}	98±4	72±2 ^c	81±1 ^d	62±3 ^{ac}	73±7 ^{cd}	62±3 ^{bc}
Mg	3289±85 ^a	2044±19	5500±81	2835±30	6671±139	3358±26 ^a	3695±32
Al	1862±94	1612±54	669±15 ^{ab}	693±56 ^{cd}	219±15	667±104 ^{ac}	668±74 ^{bd}
K	14448±355	20289±294	28373±568 ^{ab}	29794±340	27528±303 ^{ac}	26020±259	27800±445 ^{bc}
Ca	9763±198	7783±104	14800±219	12254±125 ^a	13115±277	10803±96	12072±78 ^a
Fe	1430±62 ^a	1322±62 ^a	498±16 ^{bcd}	616±69 ^b	187±9	476±78 ^{cc}	443±44 ^{dc}
P	1705±31	2187±34	2409±52	2065±22	2961±45	2877±25 ^a	2822±23 ^a
<i>Mikroelementi (µg kg⁻¹ s. tv.)</i>							
V	3380±96	3793±130	1103±17 ^{ab}	1474±131	383±23	1132±185 ^{ac}	1058±112 ^{bc}
Mn	48±2 ^a	59±1 ^b	214±3	57±2 ^b	185±7	43±1 ^a	66±1
Cr	3294±104	2873±77	2073±16 ^a	1980±175 ^a	368±16	1547±88	1118±140
Co	521±18	588±4	267±5	314±29	129±9	165±17 ^a	177±13 ^a
Ni	2029±67 ^a	1635±17 ^{bc}	2008±9 ^a	1668±109 ^b	1549±54 ^c	3284±162	2651±68
Cu	8±0	14±0	9±0 ^a	8.74±0 ^a	9.90±0 ^b	11±1	9.86±0 ^b
Zn	26±0	29±0 ^a	53±1	30±1 ^a	63±1	55±1	44±0
As	369±6	460±5	209±3 ^a	192±55 ^{ab}	62±3	147±22 ^{bc}	126±13 ^c
Se	19±1	24±1 ^{abc}	25±3 ^{adc}	14±1 ^f	13±1 ^f	26±2 ^{bdg}	25±1 ^{ceg}
Mo	1228±21 ^a	1355±23	337±2	1231±16 ^a	831±10	637±50	481±0
Cd	14±0 ^{abc}	19±1 ^{def}	88±5	11±1 ^a	19±1 ^{bdg}	18±1 ^{ceg}	23±1 ^f
Sn	106±6 ^a	114±3 ^a	42±1 ^{bcd}	50±0 ^{bef}	42±1 ^{ceg}	75±16	44±5 ^{dfg}
Sb	38±1	53±1	19±1 ^{ab}	23±2	19±1 ^{ac}	27±2	19±1 ^{bc}
Hg	18±2 ^{ab}	30±1	18±1 ^{ac}	12±0 ^{dc}	13±1 ^d	16±1 ^{bef}	14±0 ^{ef}
TI	24±0	18±0	15±0	6±0 ^{ab}	5±0 ^a	8±1 ^c	7±1 ^{bc}
Pb	957±3	1323±17	418±5 ^a	374±52 ^{bc}	261±8 ^d	471±71 ^{ab}	327±38 ^{cd}

s.tv.-suha tvar uzorka. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti u istom retku označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.



4.2. Optimiranje pojedinih tehnika ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice

4.2.1. Konvencionalna tehnika ekstrakcije

U Tablici 20 prikazane su vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata dobričice dobivenih konvencionalnom tehnikom ekstrakcije potpomognutom zagrijavanjem (HAE) i to provođenjem eksperimenata pri 16 različitih kombinacija nezavisnih varijabli definiranih u programu Design Expert uz metodu odzivnih površina i centralno kompozitni dizajn. Značajnost svakog koeficijenta determinacije, određena pomoću *p*- i *F*-vrijednosti, prikazana je u Tablici 22. 3D dijagrami odzivnih površina (grafički prikazi regresijskih jednadžbi) prikazani su na Slici 27.

Tablica 20. Dizajn eksperimenta i rezultati udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta (ABTS i DPPH) za HAE tehniku

Redni broj eksperimenta	Nezavisne varijable			Eksperimentalne vrijednosti		
	Vrijeme (X_1) (minute)	Temperatura (X_2) ($^{\circ}\text{C}$)	Omjer uzorak/otapalo (X_3) (g mL^{-1})	Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g^{-1} s. tv.)	ABTS (mmol Trolox g^{-1} s. tv.)	DPPH (mmol Trolox g^{-1} s. tv.)
1	30	100	0,01	38,9±0,6	0,220±0,008	0,201±0,005
2	30	80	0,01	37,8±0,3	0,190±0,003	0,168±0,001
3	20	80	0,025	32,4±0,6	0,161±0,003	0,092±0,000
4	10	100	0,04	31,3±0,3	0,107±0,000	0,088±0,000
5	20	100	0,025	35,8±0,4	0,180±0,004	0,168±0,002
6	20	90	0,025	34,9±0,6	0,171±0,003	0,155±0,005
7	10	90	0,025	37,1±0,5	0,182±0,003	0,168±0,001
8	30	90	0,025	35,2±0,8	0,176±0,005	0,158±0,002
9	10	100	0,01	40,6±0,9	0,209±0,005	0,209±0,006
10	30	80	0,04	27,5±0,2	0,109±0,000	0,046±0,000
11	10	80	0,04	27,6±0,4	0,111±0,000	0,047±0,000
12	20	90	0,04	30,1±0,6	0,091±0,000	0,080±0,000
13	10	80	0,01	36,0±0,5	0,180±0,005	0,165±0,002
14	30	100	0,04	30,9±0,7	0,110±0,000	0,090±0,000
15	20	90	0,025	34,6±1,0	0,162±0,000	0,161±0,002
16	20	90	0,01	38,2±0,7	0,198±0,007	0,187±0,003

s.tv.-suha tvar uzorka; EGK-ekvivalenti galne kiseline

Najniža vrijednost udjela ukupnih polifenola određena je u eksperimentu broj 10 (30 minuta, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,04\text{ g mL}^{-1}$) i iznosila je $27,5\text{ mg EGK g}^{-1}$ s. tv., dok je najviša vrijednost dobivena eksperimentom 9 (10 minuta, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,01\text{ g mL}^{-1}$) i iznosila je $40,6\text{ mg EGK g}^{-1}$ s. tv. Najviši antioksidacijski kapacitet ($0,220\text{ mmol Trolox g}^{-1}$ s. tv.) određen ABTS metodom utvrđen je za



ekstrakt eksperimenta broj 1 (30 minuta, 100 °C, 0,01 g mL⁻¹), dok je najviši antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH metode određen u eksperimentu 9 (10 minuta, 100 °C, 0,01 g mL⁻¹) te je iznosio 0,209 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom pokazao je dobru korelaciju s udjelom ukupnih polifenola ($R^2 = 0,9628$), dok je korelacija između antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom i udjela ukupnih polifenola bila nešto niža ($R^2 = 0,7917$).

Eksperimentalni podaci opisani su kvadratnim modelom. Primjenom višestruke regresijske analize na eksperimentalne podatke dobivene su kvadratne jednadžbe [11], [12] i [13], kojima se može izraziti model za zavisne varijable.

$$\text{Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 35,33 - 0,2473 X_1 + 1,62 X_2 - 4,42 X_3 - 0,4639 X_1 X_2 - 0,0927 X_1 X_3 + 0,1822 X_2 X_3 + 0,8585 X_1^2 - 1,21 X_2^2 - 1,15 X_3^2 \quad [11]$$

$$\text{DPPH (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,1560 - 0,0014 X_1 + 0,0237 X_2 - 0,0579 X_3 - 0,0010 X_1 X_2 + 0,0009 X_1 X_3 + 0,0012 X_2 X_3 + 0,0107 X_1^2 - 0,0223 X_2^2 - 0,0186 X_3^2 \quad [12]$$

$$\text{ABTS (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,1708 + 0,0016 X_1 + 0,0075 X_2 - 0,0470 X_3 + 0,0008 X_1 X_2 - 0,0027 X_1 X_3 - 0,0077 X_2 X_3 + 0,0086 X_1^2 + 0,0003 X_2^2 - 0,0253 X_3^2 \quad [13]$$

Kako bi se evaluirao model s obzirom na zavisne varijable, provedena je analiza varijance ($p < 0,05$), a rezultati su prikazani u Tablici 21. Prihvatljivost modela određena je s obzirom na koeficijent determinacije (R^2), p -vrijednost regresijskog modela i p -vrijednost neuklopljenosti modela (engl. *lack-of-fit*) te ostale važne parametre.

R^2 predstavlja omjer varijance opisane modelom i ukupne varijance. Približavanjem R^2 vrijednosti 1, empirijski model bolje opisuje eksperimentalne podatke. Vrijednosti R^2 za sve odzive više su od 0,80 (udjel ukupnih polifenola: 0,9775; DPPH: 0,9806; ABTS: 0,9858), što ukazuje na prikladnost modela (Arruda i sur., 2017). Dobivene vrijednosti R^2 ukazuju na postotak varijacija koje nisu opisane modelom, a iznose 2,25 % (udjel ukupnih polifenola), 1,94 % (DPPH) i 1,42 % (ABTS). Ovaj pokazatelj nije dovoljan za određivanje prikladnosti modela, već je važna i razlika između vrijednosti R^2 i prilagođenog R^2 , koja mora biti niža od 0,1, što je utvrđeno za ovaj model. Prilagođeni R^2 predstavlja R^2 nakon izbacivanja beznačajnih komponenti iz modela, a razlika između njih manja od 0,1 ukazuje na održanje kvalitete modela nakon njegove redukcije (Arruda i sur., 2017). Osim toga, vrijednost adekvatne preciznosti određuje omjer signala i šuma odziva te mora biti veća od 4 kako bi signal bio adekvatan, što je uočeno kod svih rezultata (udjel ukupnih polifenola: 18,979; DPPH: 19,755; ABTS: 22,288).



Tablica 21. Analiza varijance (ANOVA) odabranog kvadratnog modela HAE tehnike

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>a) Odziv: Udjel ukupnih polifenola</i>					
Model	235,82	9	26,20	33,82	< 0,0001
Ostatak	5,42	7	0,7747		
Nedostatak uklopljenosti	3,06	5	0,6116	0,5173	0,7612
Čista pogreška	2,36	2	1,18		
Ukupna korelacija	241,24	16			
$R^2=0,9775$; $R^2_{\text{prilagodjen}}=0,9486$; $R^2_{\text{predvidjen}}=0,7993$; CV=2,56; adekvatna preciznost=18,979					
<i>b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)</i>					
Model	0,0431	9	0,0048	39,38	< 0,0001
Ostatak	0,0009	7	0,0001		
Nedostatak uklopljenosti	0,0008	5	0,0002	4,17	0,2048
Čista pogreška	0,0001	2	0,0000		
Ukupna korelacija	0,0439	16			
$R^2=0,9806$; $R^2_{\text{prilagodjen}}=0,9557$; $R^2_{\text{predvidjen}}=0,8613$; CV=7,98; adekvatna preciznost=19,755					
<i>c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)</i>					
Model	0,0253	9	0,0028	53,90	< 0,0001
Ostatak	0,0004	7	0,0017		
Nedostatak pristajanja	0,0002	5	0,0000	0,3847	0,8317
Čista pogreška	0,0002	2	0,0001		
Ukupna korelacija	0,0253	16			
$R^2=0,9858$; $R^2_{\text{prilagodjen}}=0,9675$; $R^2_{\text{predvidjen}}=0,9315$; CV=4,48; adekvatna preciznost=22,2878					

Niske vrijednosti koeficijenta varijacije (udjel ukupnih polifenola: 2,56; DPPH: 7,98; ABTS: 4,48) ukazuju na dobru preciznost i pouzdanost eksperimentalnih rezultata. Također, p -vrijednost modela niža od 0,5 ukazuje na važnost modela i njegovu prikladnost u opisivanju eksperimentalnih podataka te je u ovom slučaju niža od 0,0001 za sve rezultate. Prikladnost modela određuje se i pomoću testa neusklađenosti, čija p -vrijednost mora biti viša od 0,05 kako bi neusklađenost bila beznačajna u odnosu na čistu pogrešku (Arruda i sur, 2017). U ovome istraživanju, p -vrijednost testa neusklađenosti za sve odzive viša je od 0,05 (udjel ukupnih polifenola: 0,7612; DPPH: 0,2048; ABTS: 0,8317), što ukazuje na prikladnost modela za opis eksperimentalnih podataka. Srednji kvadrati čistih pogreški za sve rezultate bili su niski (udjel ukupnih polifenola: 1,18; DPPH: 0,0000; ABTS: 0,0001), što također ukazuje na prikladnost



modela. Značajnost svakog koeficijenta determinacije određena pomoću p - i F -vrijednosti prikazana je u Tablici 22.

Tablica 22. Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za kvadratni model HAE tehnike

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F -vrijednost	p -vrijednost
<i>a) Odziv: Udjel ukupnih polifenola</i>					
X_1 (vrijeme)	0,6116	1	0,6116	0,7894	0,4038
X_2 (temperatura)	26,11	1	26,11	33,70	0,0007
X_3 (omjer uzorak/otapalo)	195,26	1	195,26	252,06	< 0,0001
X_1X_2	1,72	1	1,72	2,22	0,1797
X_1X_3	0,0688	1	0,0688	0,0888	0,7744
X_2X_3	0,2655	1	0,2655	0,3427	0,5766
X_1^2	1,97	1	1,97	2,55	0,1544
X_2^2	3,90	1	3,90	5,04	0,0597
X_3^2	3,54	1	3,54	4,57	0,0699
<i>b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)</i>					
X_1 (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,1600	0,7011
X_2 (temperatura)	0,0056	1	0,0056	46,31	0,0003
X_3 (omjer uzorak/otapalo)	0,0335	1	0,0335	275,92	< 0,0001
X_1X_2	$8,213 \times 10^{-6}$	1	$8,213 \times 10^{-6}$	0,0676	0,8023
X_1X_3	$6,030 \times 10^{-6}$	1	$6,030 \times 10^{-6}$	0,0496	0,8301
X_2X_3	0,0000	1	0,0000	0,0983	0,7630
X_1^2	0,0003	1	0,0003	2,50	0,1577
X_2^2	0,0013	1	0,0013	10,96	0,0129
X_3^2	0,0009	1	0,0009	7,67	0,0277
<i>c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)</i>					
X_1 (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,4887	0,5071
X_2 (temperatura)	0,0006	1	0,0006	10,82	0,0133
X_3 (omjer uzorak/otapalo)	0,0221	1	0,0221	425,05	< 0,0001
X_1X_2	$5,612 \times 10^{-6}$	1	$5,612 \times 10^{-6}$	0,1078	0,7523
X_1X_3	0,0001	1	0,0001	1,10	0,3291
X_2X_3	0,0005	1	0,0005	9,15	0,0193
X_1^2	0,0002	1	0,0002	3,83	0,0914
X_2^2	$2,508 \times 10^{-7}$	1	$2,508 \times 10^{-7}$	0,0048	0,9466
X_3^2	0,0017	1	0,0017	32,95	0,0007

Iz prikazanih vrijednosti vidljivo je da dvije nezavisne varijable (X_2 – temperatura i X_3 – omjer uzorak/otapalo) statistički značajno utječu ($p < 0,05$) na udjel ukupnih polifenola i

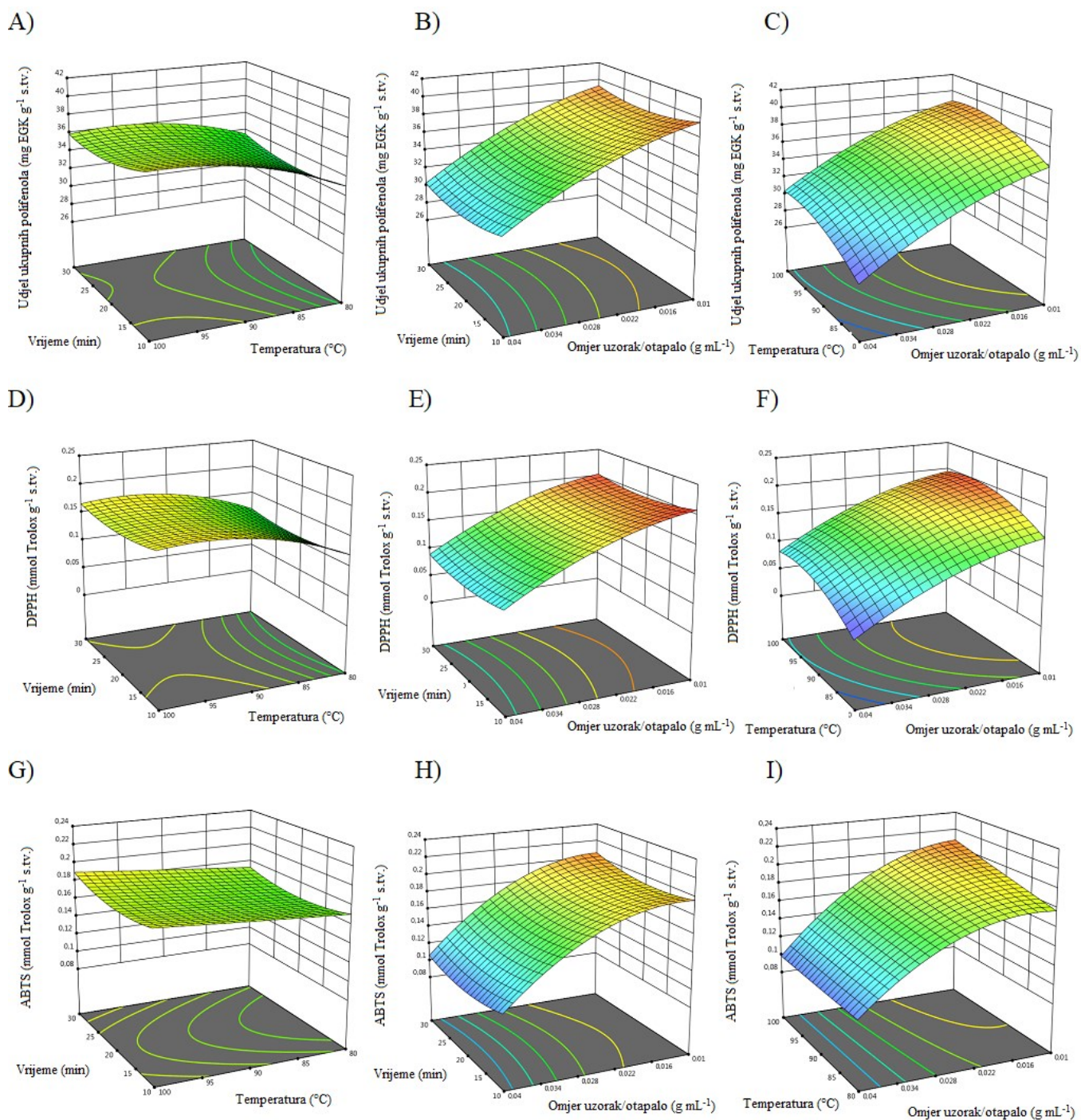


antioksidacijski kapacitet. Na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom statistički značajan utjecaj imaju kvadrat temperature (X_2^2) i omjera uzorak/otapalo (X_3^2). Značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom imaju kvadrat omjera uzorak/otapalo (X_3^2) te međusobna interakcija temperature i omjera uzorak/otapalo (X_2X_3). Najznačajniji utjecaj na sve tri zavisne varijable ima omjer uzorak/otapalo ($p < 0,0001$), što se može uočiti i na 3D dijagramima odzivnih površina (grafičkim prikazima regresijskih jednadžbi) prikazanim na Slici 27.

Na 3D dijagramima može se uočiti povećanje svih odziva približavanjem omjera uzorak/otapalo vrijednosti od $0,01 \text{ g mL}^{-1}$. Također, povećanje temperature do maksimalnih 100 °C dovodi do povećanja odzivnih vrijednosti.

Optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli u svrhu dobivanja što viših vrijednosti za udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određene su pomoću 3D odzivnih površina (Slika 27) i matematičkih modela ([11], [12] i [13]). Određeni optimalni uvjeti za HAE su 10 minuta za vrijeme, 100 °C za temperaturu i $0,01 \text{ g mL}^{-1}$ za omjer uzorak/otapalo. Dobivene eksperimentalne vrijednosti za udjel ukupnih polifenola ($40,6 \text{ mg EGK g}^{-1} \text{ s. tv.}$) i antioksidacijski kapacitet ($0,209 \text{ mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.}$ za obje metode) vrlo su slične predviđenim vrijednostima (udjel ukupnih polifenola: $40,3 \text{ mg EGK g}^{-1} \text{ s. tv.}$; DPPH: $0,209 \text{ mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.}$; ABTS: $0,212 \text{ mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.}$), pri čemu relativne pogreške iznose redom 2,49, 0,00 i 1,44 %. To ukazuje na prikladnost modela za predviđanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u realnim sustavima.





Slika 27. HAE: 3D prikaz odzivnih površina za utjecaje 1.) A) temperature i vremena; B) omjera uzorak/otapalo i vremena; i C) temperature i omjera uzorak/otapalo; na udjel ukupnih polifenola; 2.) D) vremena i temperature; E) vremena i omjera uzorak/otapalo; i F) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom; 3.) G) temperature i vremena; H) omjera uzorak/otapalo i vremena; i I) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom



4.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

U Tablici 23 prikazane su vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata dobričice dobivenih tehnikom ekstrakcije potpomognutom mikrovalovima (MAE) i to provođenjem eksperimenata pri 16 različitih kombinacija nezavisnih varijabli u programu Design Expert uz metodu odzivnih površina i centralno kompozitni dizajn. Značajnost svakog koeficijenta determinacije, određena pomoću p - i F -vrijednosti, prikazana je u Tablici 25. 3D dijagrami odzivnih površina (grafički prikazi regresijskih jednadžbi) prikazani su na Slici 28.

Tablica 23. Dizajn eksperimenata i rezultati udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta (ABTS i DPPH) za MAE tehniku

Redni broj eksperimenata	Nezavisne varijable			Eksperimentalni podaci		
	Vrijeme (X_1) (minute)	Temperatura (X_2) ($^{\circ}\text{C}$)	Omjer uzorak/otapalo (X_3) (g mL^{-1})	Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g^{-1} s. tv.)	ABTS ($\text{mmol Trolox g}^{-1}$ s. tv.)	DPPH ($\text{mmol Trolox g}^{-1}$ s. tv.)
1	3	90	0,01	48,6±0,2	0,302±0,034	0,218±0,009
2	3	70	0,025	35,4±1,0	0,209±0,005	0,174±0,005
3	9	50	0,04	28,6±0,2	0,171±0,006	0,137±0,002
4	3	90	0,04	38,1±0,6	0,207±0,003	0,172±0,002
5	9	70	0,025	35,1±0,3	0,220±0,001	0,173±0,005
6	6	50	0,025	33,4±0,7	0,210±0,007	0,167±0,005
7	6	90	0,025	44,4±1,9	0,250±0,005	0,221±0,008
8	6	70	0,025	35,4±0,4	0,219±0,005	0,180±0,003
9	9	90	0,04	41,3±1,3	0,227±0,003	0,179±0,001
10	3	50	0,01	36,9±0,4	0,202±0,005	0,194±0,002
11	6	70	0,025	35,8±0,6	0,179±0,010	0,181±0,004
12	9	90	0,01	47,4±1,4	0,226±0,006	0,236±0,007
13	6	70	0,04	32,0±0,5	0,199±0,009	0,165±0,004
14	3	50	0,04	29,6±1,1	0,179±0,004	0,151±0,004
15	6	70	0,01	39,4±0,5	0,209±0,006	0,196±0,008
16	9	50	0,01	35,8±0,4	0,202±0,009	0,194±0,009

s.tv.-suha tvar uzorka.; EGK-ekvivalenti galne kiseline

Najniža vrijednost udjela ukupnih polifenola dobivena je u eksperimentu broj 3 (9 minuta, 50 $^{\circ}\text{C}$, 0,04 g mL^{-1}) te iznosi 28,6 mg EGK g^{-1} s. tv., dok je najviša vrijednost dobivena eksperimentom 1 (3 minute, 90 $^{\circ}\text{C}$, 0,01 g mL^{-1}) te iznosi 48,6 mg EGK g^{-1} s. tv. Najviši antioksidacijski kapacitet (0,302 $\text{mmol Trolox g}^{-1}$ s. tv.) određen ABTS metodom dobiven je eksperimentom broj 1, dok je najviši antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH metode utvrđen za eksperiment broj 12 (9 minuta, 90 $^{\circ}\text{C}$, 0,01 g mL^{-1}) te iznosi 0,236 $\text{mmol Trolox g}^{-1}$



s. tv. Također, uočena je visoka korelacija između udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS ($R^2 = 0,68869$) i DPPH ($R^2 = 0,8387$) metodama.

Ekperimentalni podaci za udjel ukupnih polifenola opisani su kvadratnim modelom [14], dok su podaci za antioksidacijski kapacitet određeni ABTS i DPPH metodama opisani linearnim modelima ([15] i [16]). Analiza varijance prikazana je u Tablici 24.

$$\text{Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 35,70 - 0,0458 X_1 + 5,54 X_2 - 3,84 X_3 \quad [14]$$

$$+ 0,5081 X_1 X_2 + 0,5665 X_1 X_3 - 0,2707 X_2 X_3 - 0,4968 X_1^2 + 3,13 X_2^2 - 0,0371 X_3^2$$

$$\text{DPPH (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,1835 + 0,0010 X_1 + 0,0182 X_2 - 0,0235 X_3 \quad [15]$$

$$\text{ABTS (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,2178 - 0,0022 X_1 + 0,0278 X_2 - 0,0197 X_3 \quad [16]$$

Vrijednosti R^2 za sve odzive više su od 0,80 (udjel ukupnih polifenola: 0,9948; DPPH: 0,8907; ABTS: 0,8008). Postotak varijacija koje nisu opisane modelom iznosi za udjel ukupnih polifenola 0,52 %, dok je za antioksidacijski kapacitet određen DPPH i ABTS metodama taj postotak viši te iznosi redom: 10,93 % (DPPH) i 19,92 % (ABTS). Razlika između vrijednosti R^2 i prilagođenog R^2 niža je od 0,1. Ovi pokazatelji ukazuju na prikladnost modela za opisivanje eksperimentalnih podataka. Adekvatna preciznost veća od 4 (udjel ukupnih polifenola: 36,3732; DPPH: 17,9428; ABTS: 12,7930) te niske vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) (udjel ukupnih polifenola: 1,76; DPPH: 5,18; ABTS: 7,14) ukazuju na dobru preciznost i pouzdanost eksperimentalnih rezultata. p -vrijednost modela niža je od 0,5 za sve rezultate (udjel ukupnih polifenola: $<0,0001$; DPPH: $<0,0001$; ABTS: 0,0002). Za test neusklađenosti p -vrijednost viša je 0,05 te iznosi 0,3116 za udjel ukupnih polifenola, 0,0527 za DPPH i 0,2908 za ABTS. Iz navedenih rezultata, vidljivo je da je p -vrijednost testa neusklađenosti za DPPH na granici značajnosti. Srednji kvadrati čistih pogreški za sve rezultate su niski (udjel ukupnih polifenola: 0,0904; DPPH: $4,514 \times 10^{-7}$; ABTS: 0,0000). S obzirom na vrlo niski srednji kvadrat čiste pogreške, značajnost neusklađenosti može se zanemariti (Arruda i sur., 2017). Navedeni podaci ukazuju na kvalitetu modela i prikladnost modela za opisivanje eksperimentalnih podataka.



Tablica 24. Analiza varijance (ANOVA) odabranih modela (kvadratni i linearni) ekstrakcije polifenolnih spojeva MAE tehnike

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>a) Odziv: Udjel ukupnih polifenola</i>					
Model	492,32	9	54,70	126,68	< 0,0001
Ostatak	2,59	6	0,4318		
Nedostatak uklopljenosti	2,50	5	0,5001	5,53	0,3116
Čista pogreška	0,0904	1	0,0904		
Ukupna korelacija	494,91	15			
$R^2=0,9948$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,9869$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,8830$; CV=1,76; adekvatna preciznost=36,3732					
<i>b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)</i>					
Model	0,0088	3	0,0029	32,60	< 0,0001
Ostatak	0,0011	12	0,0001		
Nedostatak uklopljenosti	0,0011	11	0,0001	218,32	0,0527
Čista pogreška	$4,514 \times 10^{-7}$	1	$4,514 \times 10^{-7}$		
Ukupna korelacija	0,0099	15			
$R^2=0,8907$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,8634$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,8082$; CV=5,18; adekvatna preciznost=17,9428					
<i>c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)</i>					
Model	0,0117	3	0,0039	16,08	0,0002
Ostatak	0,0029	12	0,0002		
Nedostatak uklopljenosti	0,0029	11	0,0003	6,83	0,2908
Čista pogreška	0,0000	1	0,0000		
Ukupna korelacija	0,0146	15			
$R^2=0,8008$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,7510$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,5704$; CV=7,14; adekvatna preciznost=12,7930					

Značajnost koeficijenta determinacije određena pomoću p - i F -vrijednosti prikazana je u Tablici 25.

Iz prikazanih vrijednosti vidljivo je da kod MAE tehnike nezavisne varijable X_2 (temperatura) i X_3 (omjer uzorak/otapalo) značajno utječu na udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Na udjel ukupnih polifenola također značajno utječe i kvadrat temperature (X_2^2), a interakcija vremena i omjera uzorak/otapalo (X_1X_3) nalazi se na granici značajnosti. p -vrijednosti za temperaturu manje su od 0,0001 za sva tri odziva, dok za omjer uzorak/otapalo iznose $p < 0,0001$ za udjel ukupnih polifenola i DPPH te 0,0018 za ABTS, što znači da na udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet mjereno DPPH metodom najveći utjecaj ima temperatura (X_2), dok na antioksidacijski kapacitet mjereno ABTS metodom najveći utjecaj ima omjer uzorak/otapalo (X_3). Povećanje vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta s povišenjem temperature i smanjenjem omjera uzorak/otapalo potvrđen je i 3D prikazima regresijskih krivulja (Slika 28).

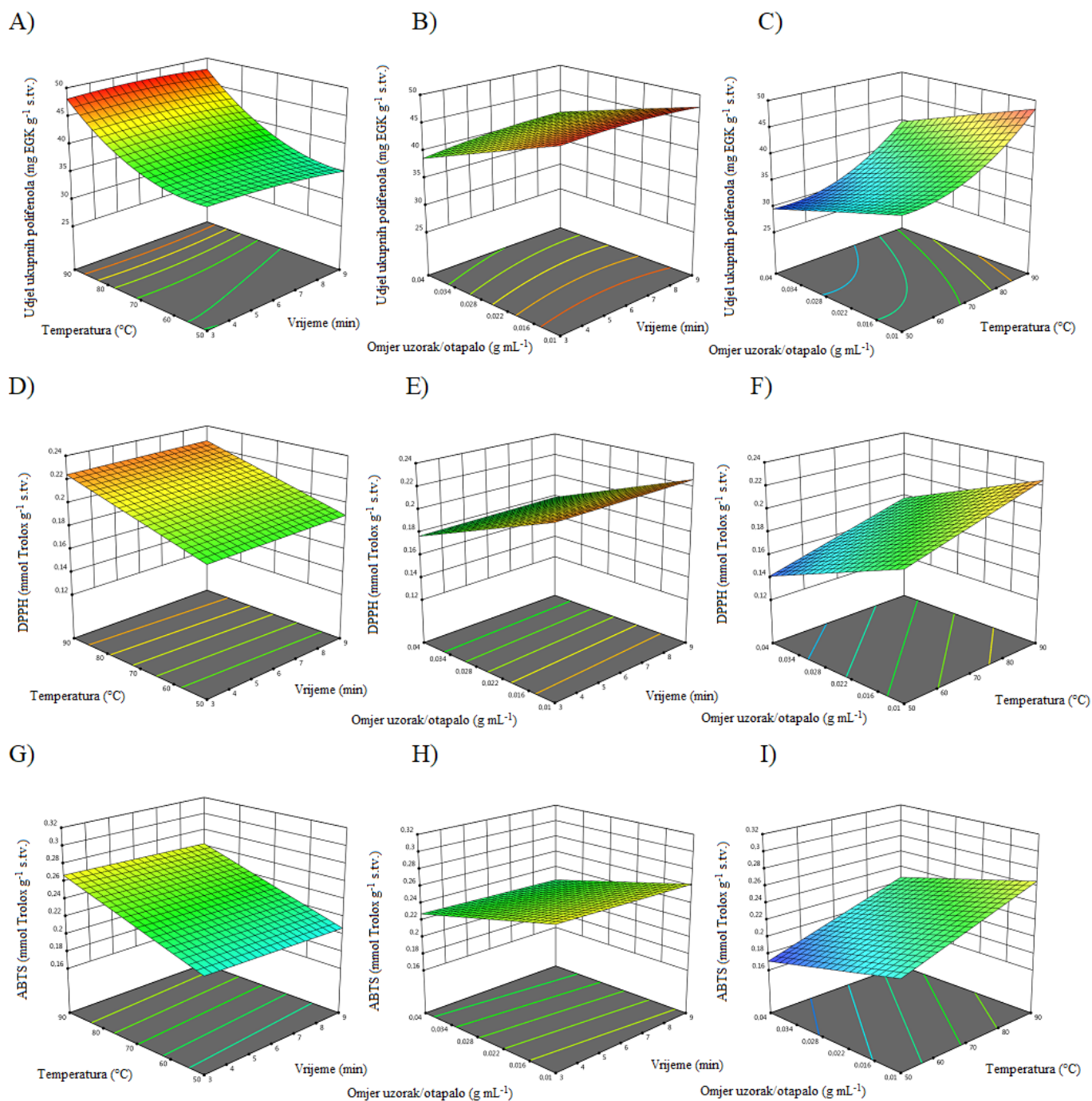


Tablica 25. Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za kvadratni i linearni model MAE tehnike

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>a) Odziv: Udjel ukupnih polifenola</i>					
X ₁ (vrijeme)	0,0210	1	0,0210	0,0486	0,8328
X ₂ (temperatura)	307,43	1	307,43	711,97	< 0,0001
X ₃ (omjer uzorak/otapalo)	147,83	1	147,83	342,35	< 0,0001
X ₁ X ₂	2,07	1	2,07	4,78	0,0714
X ₁ X ₃	2,57	1	2,57	5,95	0,0506
X ₂ X ₃	0,5864	1	0,5864	1,36	0,2881
X ₁ ²	0,6506	1	0,6506	1,51	0,2656
X ₂ ²	25,78	1	25,78	59,71	0,0002
X ₃ ²	0,0036	1	0,0036	0,0084	0,9300
<i>b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)</i>					
X ₁ (vrijeme)	9,266 x 10 ⁻⁶	1	9,266 x 10 ⁻⁶	0,1025	0,7543
X ₂ (temperatura)	0,0033	1	0,0033	36,50	< 0,0001
X ₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0055	1	0,0055	61,20	< 0,0001
<i>c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)</i>					
X ₁ (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,2055	0,6584
X ₂ (temperatura)	0,0078	1	0,0078	32,05	0,0001
X ₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0039	1	0,0039	16,00	0,0018

Optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli određene su pomoću 3D odzivnih površina prikazanih na Slici 28 i matematičkih modela ([14], [15] i [16]). Određeni optimalni uvjeti za MAE su 4,93 minute za vrijeme, 90 °C za temperaturu i 0,01 g mL⁻¹ za omjer uzorak/otapalo. Odzivne vrijednosti određene pri definiranim optimalnim uvjetima ekstrakcije za udjel ukupnih polifenola (42,9 mg EGK g⁻¹ s. tv.) i antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom (0,263 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.) i DPPH metodom (0,243 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.) vrlo su slične predviđenim vrijednostima (udjel ukupnih polifenola: 48,4 mg EGK g⁻¹ s. tv.; ABTS: 0,266 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.; DPPH: 0,225 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.), pri čemu relativne pogreške iznose redom 12,82, 0,14 i 7,41 %.





Slika 28. MAE: 3D prikaz odzivnih površina za utjecaje 1.) A) temperature i vremena; B) omjera uzorak/otapalo i vremena; i C) temperature i omjera uzorak/otapalo; na udjel ukupnih polifenola; 2.) D) vremena i temperature; E) vremena i omjera uzorak/otapalo; i F) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom; 3.) G) temperature i vremena; H) omjera uzorak/otapalo i vremena; i I) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom



4.2.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom

U Tablici 26 prikazane su vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata dobričice dobivenih tehnikom ekstrakcije subkritičnom vodom (SWE) i to provođenjem eksperimenata pri 16 različitih kombinacija nezavisnih varijabli u programu Design Expert uz metodu odzivnih površina i centralno kompozitni dizajn. Značajnost svakog koeficijenta determinacije, određena pomoću p - i F -vrijednosti, prikazana je u Tablici 28. 3D dijagrami odzivnih površina (grafički prikazi regresijskih jednadžbi) prikazani su na Slici 29.

Tablica 26. Dizajn eksperimenta i rezultati udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta (ABTS i DPPH) za SWE tehniku

Redni broj eksperimenta	Nezavisne varijable			Eksperimentalni podaci		
	Vrijeme (X_1) (minute)	Temperatura (X_2) ($^{\circ}\text{C}$)	Omjer uzorak/otapalo (X_3) (g mL^{-1})	Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g^{-1} s.tv.)	ABTS (mmol Trolox g^{-1} s. tv.)	DPPH (mmol Trolox g^{-1} s. tv.)
1	10	160	0,01	43,9±0,8	0,234±0,001	0,188±0,002
2	15	200	0,04	27,4±0,0	0,188±0,001	0,276±0,001
3	15	160	0,025	28,8±0,6	0,169±0,000	0,128±0,001
4	5	120	0,01	35,7±0,4	0,190±0,003	0,164±0,000
5	10	120	0,025	21,2±0,6	0,117±0,000	0,097±0,003
6	5	200	0,01	60,1±2,6	0,349±0,017	0,280±0,004
7	10	160	0,025	27,7±0,2	0,159±0,002	0,121±0,001
8	10	160	0,025	30,9±0,6	0,167±0,003	0,131±0,001
9	15	200	0,01	62,6±1,5	0,358±0,002	0,293±0,001
10	10	160	0,04	22,8±0,3	0,131±0,001	0,095±0,002
11	5	120	0,04	18,4±0,3	0,102±0,001	0,082±0,000
12	15	120	0,04	21,1±0,0	0,123±0,003	0,093±0,000
13	5	160	0,025	31,7±0,9	0,184±0,006	0,142±0,000
14	10	200	0,025	34,7±0,1	0,201±0,000	0,159±0,002
15	15	120	0,01	34,0±0,4	0,185±0,006	0,150±0,001
16	5	200	0,04	30,8±0,0	0,209±0,001	0,283±0,000

s.tv.-suha tvar uzorka.; EGK-ekvivalenti galne kiseline

Najniža vrijednost udjela ukupnih polifenola dobivena je u eksperimentu broj 11 (5 minuta, 120 $^{\circ}\text{C}$, 0,04 g mL^{-1}) te iznosi 18,4 mg EGK g^{-1} s. tv., dok je najviša vrijednost dobivena eksperimentom broj 9 (15 minuta, 200 $^{\circ}\text{C}$, 0,01 g mL^{-1}) te iznosi 62,6 mg EGK g^{-1} s. tv. Eksperimentom broj 9 određeni su i najviši antioksidacijski kapaciteti za obje metode (ABTS: 0,358 $\text{mmol Trolox g}^{-1}$ s. tv.; DPPH: 0,293 $\text{mmol Trolox g}^{-1}$ s. tv.). Utvrđena je visoka korelacija



između udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS ($R^2 = 0,8920$) i DPPH ($R^2 = 0,9845$) metodama.

Niže navedenim jednadžbama [17] [18] i [19] izražen je kvadratni model za zavisne varijable udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i ABTS metodama. Analiza varijance prikazana je u Tablici 27.

$$\text{Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 23,39 - 0,2800 X_1 + 8,51 X_2 - 11,58 X_3 - 0,2455 X_1 X_2 - 0,1685 X_1 X_3 - 4,29 X_2 X_3 + 2,32 X_1^2 + 0,0205 X_2^2 + 5,42 X_3^2 \quad [17]$$

$$\text{DPPH (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,1123 - 0,0012 X_1 + 0,0705 X_2 - 0,0246 X_3 + 0,0011 X_1 X_2 + 0,0004 X_1 X_3 + 0,0156 X_2 X_3 + 0,0294 X_1^2 + 0,0294 X_2^2 + 0,0366 X_3^2 \quad [18]$$

$$\text{ABTS (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s. tv.)} = 0,1574 - 0,0010 X_1 + 0,0589 X_2 - 0,0563 X_3 - 0,0037 X_1 X_2 - 0,0005 X_1 X_3 - 0,0200 X_2 X_3 + 0,0220 X_1^2 + 0,0047 X_2^2 + 0,0283 X_3^2 \quad [19]$$

Tablica 27. Analiza varijance (ANOVA) odabranog kvadratnog modela ekstrakcije polifenolnih spojeva SWE tehnike

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>a) Odziv: Udjel ukupnih polifenola</i>					
Model	2387,63	9	265,29	45,47	< 0,0001
Ostatak	35,01	6	5,83		
Nedostatak uklopljenosti	29,84	5	5,97	1,15	0,6053
Čista pogreška	5,17	1	5,17		
Ukupna korelacija	2422,64	15			
$R^2=0,9855$; $R^2_{\text{prilagodjen}}=0,9639$; $R^2_{\text{predvidjen}}=0,8114$; CV=7,27; adekvatna preciznost=21,458					
<i>b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)</i>					
Model	0,0768	9	0,0085	8,28	0,0091
Ostatak	0,0062	6	0,0010		
Nedostatak uklopljenosti	0,0061	5	0,0012	25,31	0,1497
Čista pogreška	0,0000	1	0,0000		
Ukupna korelacija	0,0830	15			
$R^2=0,9255$; $R^2_{\text{prilagodjen}}=0,8138$; $R^2_{\text{predvidjen}}=0,3691$; CV=19,15; adekvatna preciznost =8,5245					
<i>c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)</i>					
Model	0,0776	9	0,0086	36,12	0,0002
Ostatak	0,0014	6	0,0002		
Nedostatak uklopljenosti	0,0014	5	0,0003	7,68	0,2671
Čista pogreška	0,0000	1	0,0000		
Ukupna korelacija	0,0790	15			
$R^2=0,9819$; $R^2_{\text{prilagodjen}}=0,9547$; $R^2_{\text{predvidjen}}=0,7788$; CV=8,05; adekvatna preciznost =20,3617					



Vrijednosti R^2 za sve odzive više su od 0,80 (udjel ukupnih polifenola: 0,9855; DPPH: 0,9255; ABTS: 0,9819), a postotak varijacija koje nisu opisane modelom iznose 1,42 % (udjel ukupnih polifenola), 7,45 % (DPPH) i 1,09 % (ABTS). Razlika između vrijednosti R^2 i prilagođenog R^2 niža je od 0,1, što ukazuje na prikladnost modela pri opisivanju eksperimentalnih podataka. Adekvatna preciznost veća je od 4 (udjel ukupnih polifenola: 21,458; DPPH: 8,5245; ABTS: 20,3617), što ukazuje na adekvatan signal, a niske vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) (udjel ukupnih polifenola: 7,27; DPPH: 19,15; ABTS: 8,05) ukazuju na dobru preciznost i pouzdanost eksperimentalnih rezultata. p -vrijednost modela niža je od 0,5 za sve rezultate (udjel ukupnih polifenola: <0,0001; DPPH: 0,0091; ABTS: 0,0002). Za test neusklađenosti p -vrijednost viša je od 0,05 te iznosi 0,6053 za udjel ukupnih polifenola, 0,1497 za DPPH i 0,2671 za ABTS. Srednji kvadrati čistih pogreški za sve rezultate su niski (udjel ukupnih polifenola: 5,17; DPPH: 0,000; ABTS: 0,0000).

Značajnost koeficijenata determinacije određena pomoću p - i F -vrijednosti prikazana je u Tablici 28.

Iz prikazanih vrijednosti vidljivo je da na sve odzive značajno utječe nezavisna varijabla X_2 (temperatura). p -vrijednosti za temperaturu manje su od 0,0001 za udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom, dok za antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom iznosi 0,0004. Na odziv udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom također značajno utječe omjer uzorak/otapalo ($p < 0,0001$), dok je za DPPH iznad granice značajnosti. Na udjel ukupnih polifenola značajan utjecaj imaju i interakcija temperature i omjera uzorak/otapalo (X_2X_3) te kvadrat omjera uzorak/otapalo (X_3^2). Na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom značajan utjecaj ima interakcija temperature i omjera uzorak/otapalo.

Optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli određene su pomoću 3D odzivnih površina prikazanih na Slici 29 i matematičkih modela ([17], [18], [19]). Određeni optimalni uvjeti za SWE su 5 minuta, 200 °C te 0,01 g mL⁻¹. Pri definiranim optimalnim uvjetima dobivene su eksperimentalne vrijednosti za udjel ukupnih polifenola 60,1 mg EGK g⁻¹ s. tv., antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom 0,349 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. te DPPH metodom 0,280 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. Navedene vrijednosti vrlo su slične predviđenim vrijednostima (udjel ukupnih polifenola: 60,9 mg EGK g⁻¹ s. tv.; DPPH: 0,281 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.; ABTS: 0,325 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.), pri čemu su relativne pogreške za udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom niske te iznose 1,33 % i 0,001 %, dok je relativna pogreška između predviđene i dobivene vrijednosti za antioksidacijski kapacitet određen ABTS

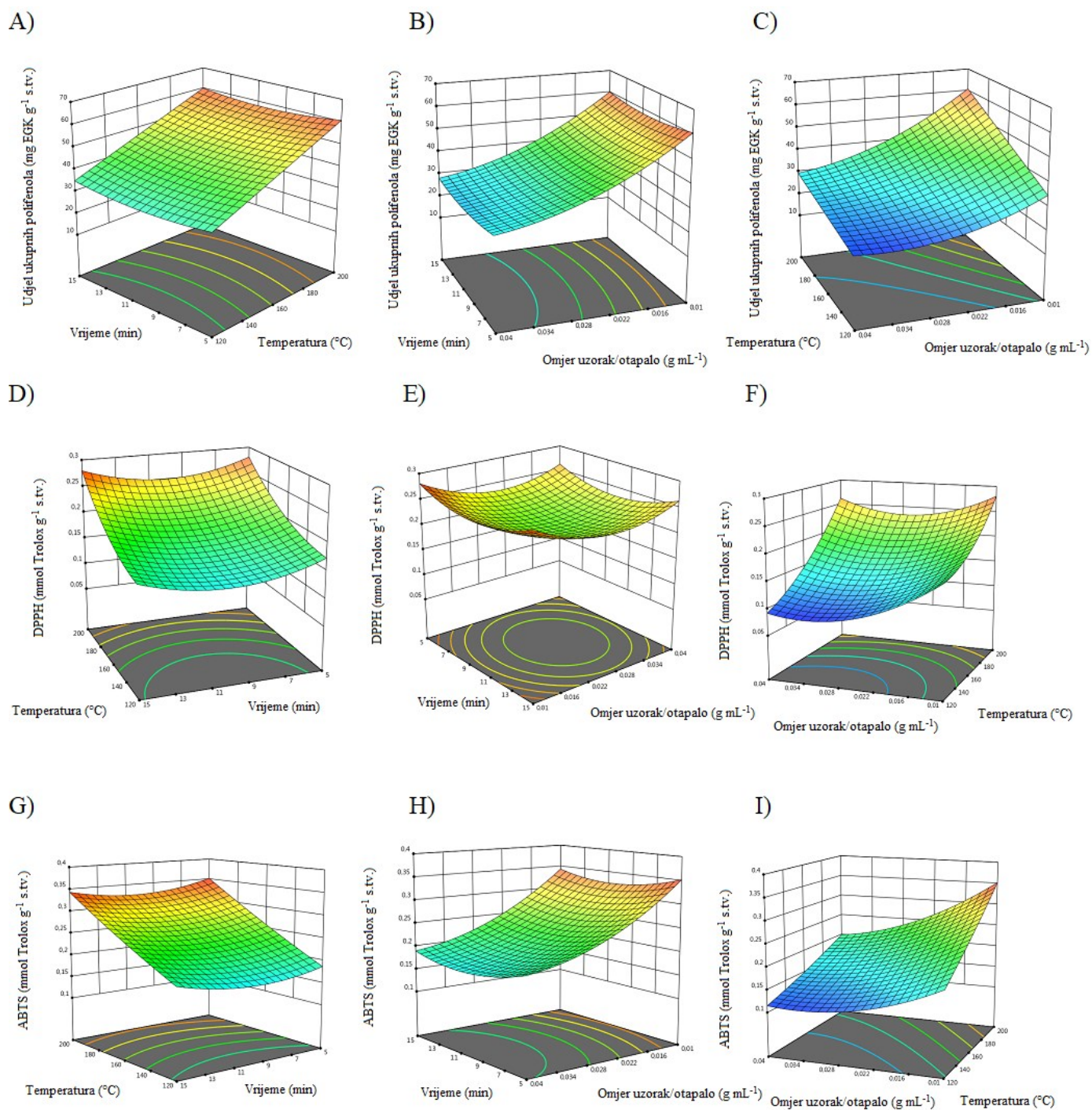


metodom nešto viša te iznosi 19,48 %. To ukazuje na bolju prikladnost modela za predviđanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom u realnim sustavima u odnosu na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom.

Tablica 28. Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za kvadratni model SWE tehnike

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>a) Odziv: Udjel ukupnih polifenola</i>					
X ₁ (vrijeme)	0,7838	1	0,7838	0,1343	0,7266
X ₂ (temperatura)	724,47	1	724,47	124,16	< 0,0001
X ₃ (omjer uzorak/otapalo)	1339,86	1	1339,86	229,63	< 0,0001
X ₁ X ₂	0,4822	1	0,4822	0,0826	0,7834
X ₁ X ₃	0,2273	1	0,2273	0,0390	0,8501
X ₂ X ₃	147,29	1	147,29	25,24	0,0024
X ₁ ²	14,13	1	14,13	2,42	0,1706
X ₂ ²	0,0011	1	0,0011	0,0002	0,9895
X ₃ ²	77,31	1	77,31	13,25	0,0108
<i>b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)</i>					
X ₁ (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,0140	0,9096
X ₂ (temperatura)	0,0496	1	0,0496	48,18	0,0004
X ₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0061	1	0,0061	5,87	0,0516
X ₁ X ₂	0,0000	1	0,0000	0,0102	0,9227
X ₁ X ₃	1,532 x 10 ⁻⁶	1	1,52 x 10 ⁻⁶	0,0015	0,9705
X ₂ X ₃	0,0020	1	0,0020	1,90	0,2175
X ₁ ²	0,0023	1	0,0023	2,21	0,1879
X ₂ ²	0,0013	1	0,0013	1,30	0,2969
X ₃ ²	0,0035	1	0,0035	3,42	0,1138
<i>c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)</i>					
X ₁ (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,0450	0,8391
X ₂ (temperatura)	0,0347	1	0,0347	145,32	< 0,0001
X ₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0317	1	0,0317	132,72	< 0,0001
X ₁ X ₂	0,0001	1	0,0001	0,4688	0,5191
X ₁ X ₃	1,797 x 10 ⁻⁶	1	1,797 x 10 ⁻⁶	0,0075	0,9337
X ₂ X ₃	0,0032	1	0,0032	13,45	0,0105
X ₁ ²	0,0013	1	0,0013	5,34	0,0602
X ₂ ²	0,0001	1	0,0001	0,2396	0,6419
X ₃ ²	0,0021	1	0,0021	8,85	0,0248





Slika 29. SWE: 3D prikaz odzivnih površina za utjecaje 1.) A) temperature i vremena; B) omjera uzorak/otapalo i vremena; i C) temperature i omjera uzorak/otapalo; na udjel ukupnih polifenola; 2.) D) vremena i temperature; E) vremena i omjera uzorak/otapalo; i F) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom; 3.) G) temperature i vremena; H) omjera uzorak/otapalo i vremena; i I) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom



4.3. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakata dobričice

Optimalni parametri istraživanih ekstrakcijskih tehnika – HAE (100 °C, 10 minuta, 0,01 g mL⁻¹), MAE (90 °C, 4,93 minuta, 0,01 g mL⁻¹) i SWE (200 °C, 5 minuta, 0,01 g mL⁻¹) definirani su na uzorku D3 te su potom primijenjeni i na preostale uzorke dobričice (uzorci D1, D2, D4, D5, D6 i D7). Dobivenim ekstraktima određen je udjel ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet te udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva. Rezultati su prikazani u Tablicama 29 i 30.

Tablica 29. Udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet uzoraka dobričice

Tehnika ekstrakcije	Uzorak	Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g ⁻¹ s. tv.)	Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox g ⁻¹ s. tv.)	
			DPPH	ABTS
HAE	D1	50,78±0,67 ^a	0,232±0,014	0,239±0,013
MAE		51,63±0,66 ^a	0,254±0,005	0,257±0,027
SWE		72,62±0,09	0,304±0,003	0,356±0,007
HAE	D2	56,20±2,75 ^b	0,266±0,010	0,322±0,003
MAE		56,10±0,40 ^b	0,324±0,007 ^d	0,336±0,008
SWE		66,82±1,66	0,329±0,004 ^d	0,399±0,004
HAE	D3	40,60±0,93 ^c	0,209±0,006	0,209±0,005
MAE		42,88±1,41 ^c	0,243±0,007	0,263±0,004
SWE		60,09±2,55	0,280±0,004	0,349±0,017
HAE	D4	87,87±2,58	0,504±0,012	0,609±0,020
MAE		94,10±4,37	0,554±0,012	0,589±0,013
SWE		101,72±0,79	0,584±0,006	0,650±0,016
HAE	D5	44,79±2,00	0,246±0,011	0,276±0,007
MAE		54,31±0,95	0,284±0,001	0,317±0,006
SWE		69,00±0,79	0,334±0,001	0,403±0,017
HAE	D6	44,86±0,82	0,208±0,006	0,248±0,006
MAE		55,72±1,35	0,273±0,002	0,319±0,011
SWE		65,63±0,53	0,286±0,001	0,388±0,012
HAE	D7	44,97±1,18	0,206±0,001	0,256±0,011
MAE		49,95±1,85	0,225±0,003	0,292±0,005
SWE		67,87±0,17	0,289±0,006	0,387±0,000

s.tv.-suha tvar uzorka; EGK-ekvivalent galne kiseline; HAE-ekstrakcija potpomognuta zagrijavanjem; MAE-ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE-ekstrakcija subkritičnom vodom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (n=3) uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti u istome stupcu unutar istog uzorka označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.



Tablica 30. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva u uzorcima dobričice

Tehnika ekstrakcije	Uzorak	Fenolne kiseline (mg g ⁻¹ s. tv.)				Flavonoidi (mg g ⁻¹ s. tv.)		
		Klorogenska kiselina	Kriptoklorogenska kiselina	Kafeinska kiselina	Ružmarinska kiselina	Rutin	Apigenin 7-(6'' malonil glikozid) ¹	Luteolin 7-O-rutinozid ²
HAE	D1	5,53±0,03	1,51±0,01	0,48±0,02 ^f	0,96±0,06	4,69±0,02	0,31±0,00	0,54±0,00
MAE		6,10±0,01	1,86±0,01	0,47±0,01 ^f	1,33±0,02	5,61±0,03	0,26±0,00	0,61±0,01
SWE		1,73±0,00	1,39±0,01	0,10±0,00	0,17±0,03	1,01±0,00	nd	0,07±0,00
HAE	D2	6,42±0,03	1,71±0,01	0,73±0,00	0,75±0,00	6,89±0,15	0,88±0,00	0,42±0,00
MAE		7,15±0,06	2,45±0,01	0,65±0,01	3,00±0,01	8,83±0,09	0,90±0,00	0,51±0,00
SWE		2,20±0,00	1,82±0,00	0,13±0,00	0,17±0,00	1,09±0,21	nd	0,05±0,00
HAE	D3	1,13±0,02 ^e	0,55±0,01	0,38±0,00	4,80±0,02	1,53±0,01	nd	nd
MAE		1,10±0,02 ^e	0,59±0,01	0,45±0,00	5,56±0,04	1,64±0,03	nd	nd
SWE		0,47±0,00	0,26±0,00	0,14±0,00	0,40±0,00	0,40±0,00	nd	nd
HAE	D4	1,65±0,05	0,83±0,04	0,84±0,01	11,03±0,15	3,89±0,02	0,27±0,00	0,35±0,01
MAE		1,78±0,01	0,96±0,01	0,60±0,00	18,69±0,14	4,38±0,03	0,26±0,00	0,40±0,00
SWE		0,99±0,02	0,73±0,01	0,24±0,00	1,07±0,00	1,01±0,12	nd	0,03±0,00
HAE	D5	1,76±0,06	0,77±0,03	0,47±0,02 ^g	0,94±0,33	0,58±0,01	0,79±0,02	0,43±0,01
MAE		2,31±0,03	1,19±0,02	0,47±0,02 ^g	4,14±0,08	1,03±0,02	0,81±0,00	0,68±0,00
SWE		1,17±0,00	0,88±0,00	0,42±0,00	0,24±0,00	0,26±0,00	nd	0,13±0,00
HAE	D6	3,14±0,11	0,87±0,05	0,62±0,03	0,40±0,03	1,88±0,00	0,35±0,01	0,35±0,00
MAE		4,98±0,01	1,80±0,01	0,71±0,00	3,54±0,01	3,95±0,02	0,40±0,00	0,39±0,00
SWE		1,52±0,00	1,38±0,01	0,11±0,00	0,21±0,00	0,82±0,00	nd	0,08±0,00
HAE	D7	3,12±0,02	1,21±0,01	0,72±0,01	1,27±0,00	3,29±0,02	0,08±0,00	0,34±0,00
MAE		3,33±0,07	1,41±0,00	0,76±0,01	2,37±0,06	3,87±0,05	0,11±0,00	0,39±0,00
SWE		1,14±0,00	1,13±0,00	0,13±0,00	0,12±0,00	1,07±0,00	nd	0,09±0,00

s.tv.-suha tvar uzorka; ¹-izraženo kao apigenin; ²-izraženo kao luteolin; nd-nije detektirano; HAE-ekstrakcija potpomognuta zagrijavanjem; MAE-ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE-ekstrakcija subkritičnom vodom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (n=3) uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti u istome stupcu unutar istog uzorka označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.



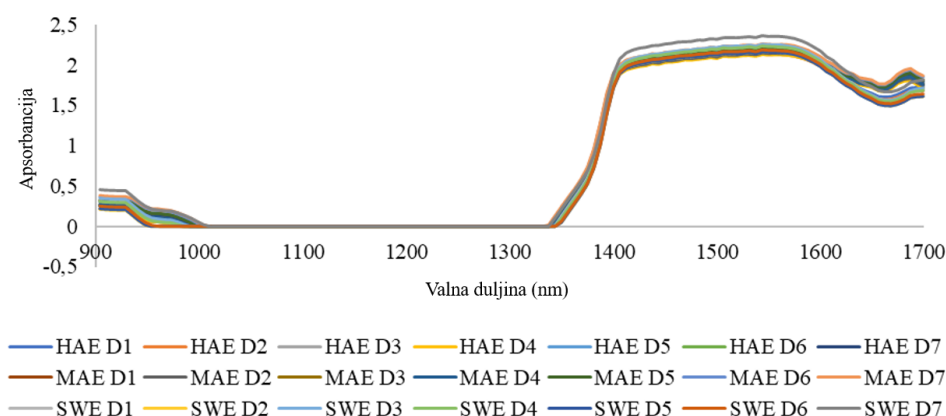
U svim uzorcima dobričice najviši udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen je u ekstraktima dobivenima SWE tehnikom. Najmanje vrijednosti određene su u uzorku D3 (60,1 mg EGK g⁻¹ s. tv.; 0,280 i 0,349 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.), a najviše u uzorku D4 (101,7 mg EGK g⁻¹ s. tv.; 0,584 i 0,650 mmol Trolox g⁻¹ s. tv.). Uzorak D3 bio je okarakteriziran s najmanjim udjelom ukupnih polifenola i primjenom HAE (40,6 mg EGK g⁻¹ s. tv.) i MAE (42,9 mg EGK g⁻¹ s. tv.) tehnika, dok je u uzorku D4 ponovno ekstrahirano najviše ukupnih polifenola primjenom obje tehnike ekstrakcije (87,9 i 95,1 mg EGK g⁻¹ s. tv.). Isto je detektirano i za antioksidacijski kapacitet. Uzimajući u obzir udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet uzoraka, učinkovitost korištenih tehnika ekstrakcije za sve uzorke može se složiti u sljedeći redoslijed: SWE > MAE > HAE. Međutim, usporedba kromatograma ekstrakata pripremljenih koristeći MAE (Slika 21a) i HAE tehnike, s kromatogramima ekstrakata dobivenih pomoću SWE tehnike (Slika 21b) otkriva značajne promjene u polifenolnom profilu ekstrakata dobričice. U ekstraktima dobivenima primjenom HAE i MAE tehnika, dominantni polifenolni spojevi bili su kafeinska, klorogenska, kriptoklorogenska i ružmarinska kiselina, iz skupine fenolnih kiselina, te rutin, iz skupine flavonoida, dok je njihov udjel u SWE ekstraktima bio statistički značajno ($p < 0,05$) niži. U SWE ekstraktima detektiran je novi dominantan spoj koji je bio podvrgnut LC-MS/MS analizi (Slika 25), ali nije uspješno identificiran. Nadalje, u ovome istraživanju, LC-MS/MS analiza otkrila je i prisutnost flavonoida apigenina i luteolina u glikoziliranim oblicima - apigenin 7-(6" malonil glikozid) i luteolin 7-O rutinozid. Važno je istaknuti neprikladnost SWE tehnike za njihovu ekstrakciju, budući da nisu identificirani ni u jednom od SWE ekstrakata.

4.4. Karakterizacija ekstrakata NIR spektroskopijom

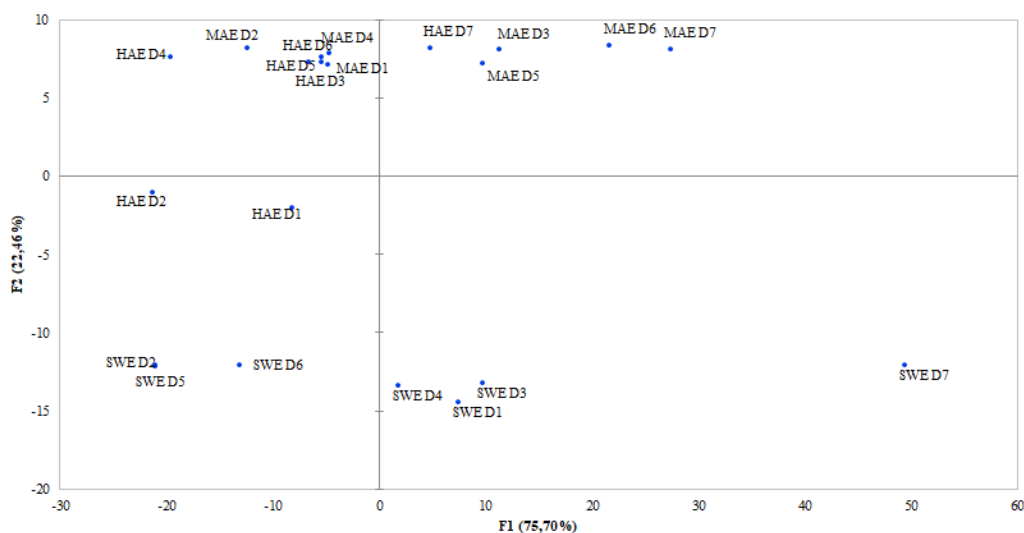
NIR spektri ekstrakata dobričice, snimani u području valnih duljina od 904 do 1699 nm, prikazani su na Slici 30.

Za PCA analizu korištene su vrijednosti apsorbancija u rasponu od 904 do 1000 nm i od 1400 do 1699 nm, a rezultati su prikazani na Slici 31.





Slika 30. NIR spektri ekstrakata dobričice



Slika 31. PCA analiza ekstrakata dobričice

4.5. Karakterizacija bioloških učinaka ekstrakta dobričice *in vitro*

Uzimajući u obzir rezultate analiza ekstrakata pripremljenih različitim tehnikama, uzorak D3 korišten je za *in vitro* analize, a kasnije i za *in vivo* i sve daljnje eksperimente. Liofilizat je pripremljen koristeći optimalne parametre HAE tehnike (poglavlje 4.2.1.).

U svrhu određivanja *in vitro* citotoksičnog, antioksidacijskog i genoprotektivnog djelovanja ekstrakta dobričice, korištene su kontinuirane humane stanične linije probavnog sustava i modelne stanične makromolekule DNK i proteina. S obzirom da su predstavnici humane mikroflore probavnog sustava u neposrednom kontaktu s biološki aktivnim spojevima unesenim hranom, citotoksični/proliferativni učinak ekstrakta određen je i na njima.



4.5.1. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na kontinuirane humane stanične linije

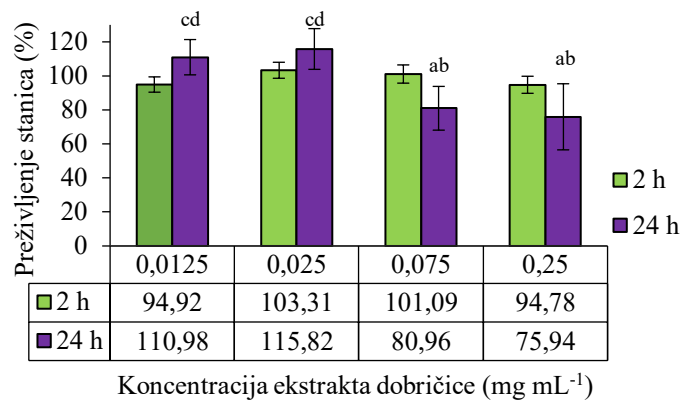
U ovome istraživanju korištene su kontinuirane humane stanične linije pločastog epitela karcinoma jezika Cal27, hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2, adenokarcinoma epitela želuca AGS te adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2, kao predstavnici epitelnih stanica koji su u direktnom kontaktu s bioaktivnim spojevima ekstrakta dobričice u probavnom sustavu nakon oralne konzumacije.

Rezultati ispitivanja citotoksičnog/proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na stanične linije Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 prikazani su grafički kao ovisnost postotka preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izražena u odnosu na kontrolu) o koncentracijama ekstrakta na Slici 32.

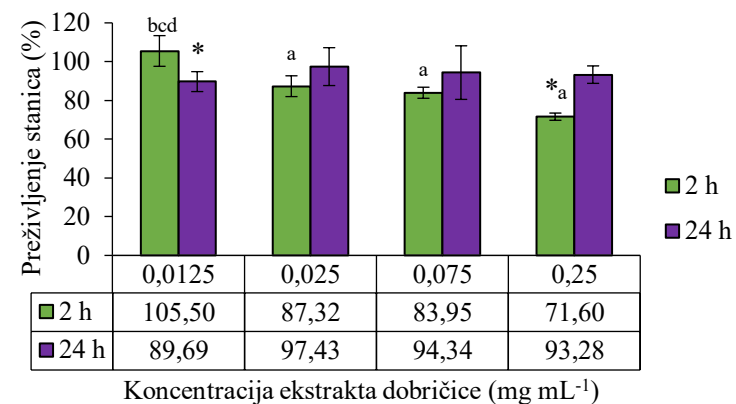
Prema dobivenim rezultatima za stanice epitela jezika Cal27, ni jedna od ispitivanih koncentracija nije pokazala statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$) na preživljenje stanica, u usporedbi s kontrolom. Međutim, uočeno je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje preživljenja stanica kod većih koncentracija ekstrakta (0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) uspoređujući s nižim (0,0125 i 0,025 mg mL⁻¹) nakon tretmana od 24 sata što upućuje na citotoksično djelovanje ekstrakta. Nadalje, tretmani stanica jetre HepG2 najnižom ispitivanom koncentracijom (0,0125 mg mL⁻¹) tijekom 24 sata i najvišom ispitivanom koncentracijom (0,25 mg mL⁻¹) ekstrakta tijekom 2 sata pokazali su statističko značajno ($p < 0,05$) smanjenje preživljenja stanica, u odnosu na kontrolu. Također, uočeno je statistički značajno ($p < 0,05$) citotoksično djelovanje viših ispitivanih koncentracija (0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹), u usporedbi s najnižom, tijekom tretmana od 2 sata. Produljenjem vremena inkubacije HepG2 stanica na 24 sata, uočen je porast preživljenja stanica kod viših koncentracija ekstrakta (0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹). Kod stanica epitela želuca AGS, ekstrakt dobričice u koncentraciji od 0,075 mg mL⁻¹ nakon tretmana od 2 sata jedini je rezultirao statistički značajnim porastom ($p < 0,05$) preživljenja u odnosu na kontrolu, dok kod stanica epitela debelog crijeva Caco-2 ekstrakt dobričice nije utjecao na preživljenje, neovisno o koncentraciji i vremenu tretmana.



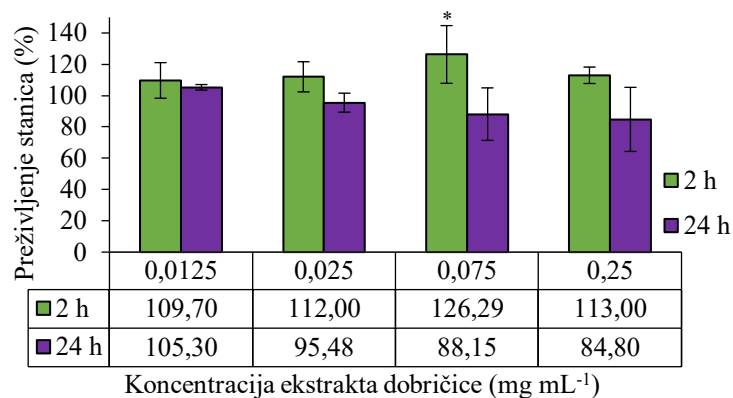
a)



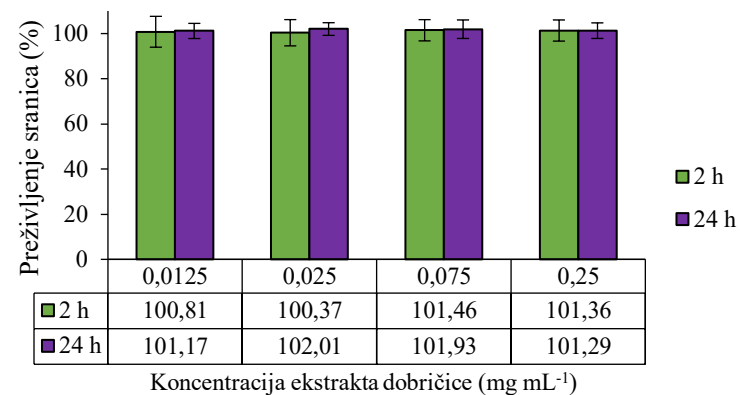
b)



c)



d)



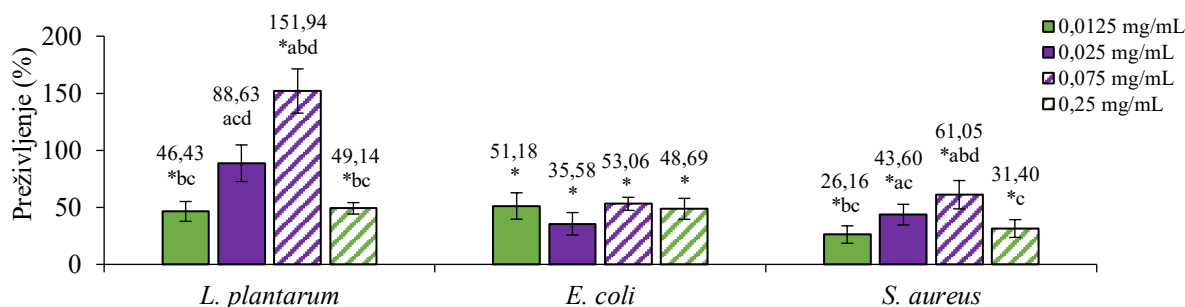
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test. *-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); d-statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$).

Slika 32. Preživljenje staničnih linija CAL27 (a), HepG2 (b), AGS (c) i Caco-2 (d) nakon 2 i 24 sata tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice



4.5.2. Određivanje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakta dobričice na predstavnike humane mikroflore

Citotoksični, odnosno proliferativni, učinak ekstrakta dobričice određivan je na bakterijama *L. plantarum*, *E. coli* i *S. aureus*, a dobiveni rezultati izraženi su kao % preživljenja nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice i prikazani su na Slici 33.



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test. *-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); d-statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$).

Slika 33. Preživljenje bakterija nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice

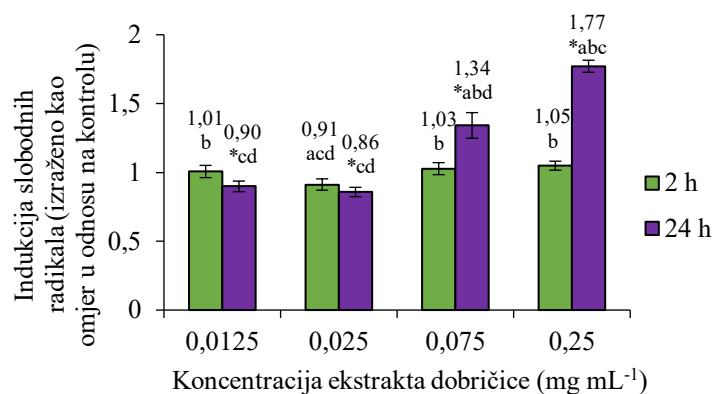
Ekstrakt dobričice u koncentracijama od 0,0125 i 0,25 mg mL⁻¹ rezultirao je statistički značajnim smanjenjem ($p < 0,05$) preživljenja bakterije *L. plantarum* u usporedbi s kontrolom. Koncentracija ekstrakta od 0,025 mg mL⁻¹ nije pokazala statistički značajan učinak ($p > 0,05$) na preživljenje iste bakterije, dok je tretman s koncentracijom od 0,075 mg mL⁻¹ rezultirao statističkim značajnim porastom ($p < 0,05$) preživljenja u odnosu na kontrolu. Preživljenje bakterija *E. coli* i *S. aureus* statistički je značajno smanjeno ($p < 0,05$) tretmanom ekstrakta u svim ispitivanim koncentracijama, u odnosu na kontrolu, iz čega proizlazi da ekstrakt pokazuje bakteriostatsko djelovanje prema oba patogena mikroorganizma. U slučaju *E. coli*, nije uočena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između ispitivanih koncentracija ekstrakta što znači da ekstrakt u svim koncentracijama ima jednako citotoksično djelovanje, dok je u slučaju *S. aureus* najizraženije statistički značajno ($p < 0,05$) citotoksično djelovanje detektirano pri koncentracijama ekstrakta od 0,0125 mg mL⁻¹ i 0,25 mg mL⁻¹.

4.5.3. Određivanje antioksidacijskog i prooksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama

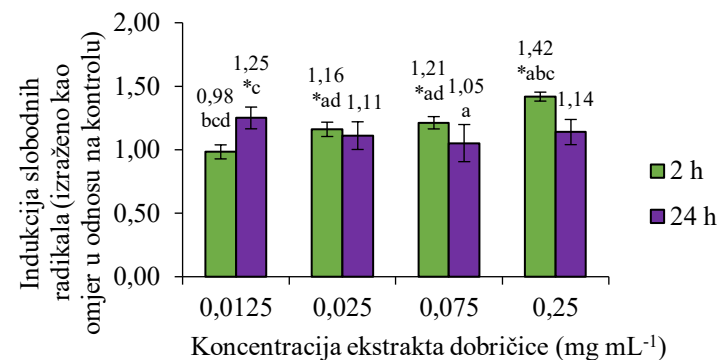
Rezultati ispitivanja prooksidacijskog/antioksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 prikazani su grafički kao ovisnost indukcije slobodnih radikala o koncentracijama ekstrakta dobričice, na Slici 34.



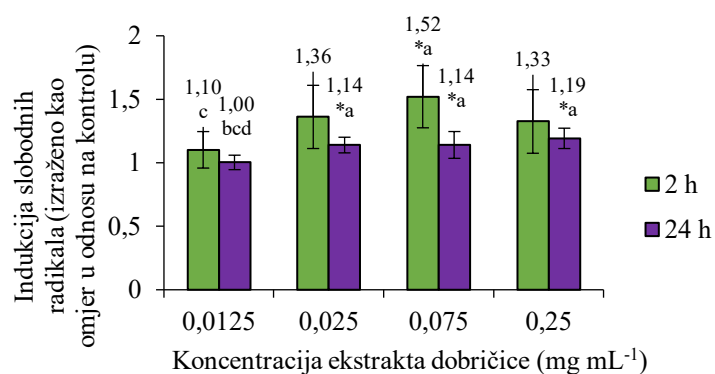
a)



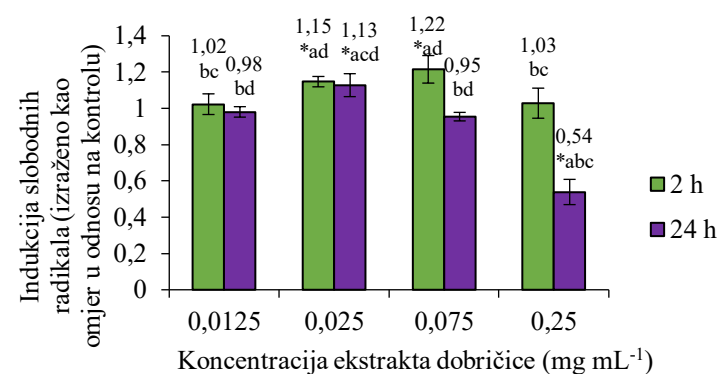
b)



c)



d)



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test. *-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); d-statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$).

Slika 34. Indukcija slobodnih radikala staničnih linija Cal27 (a), HepG2 (b), AGS (c) i Caco-2 (d) nakon 2 i 24 sata tretmana različitim koncentracijama ekstrakta dobričice



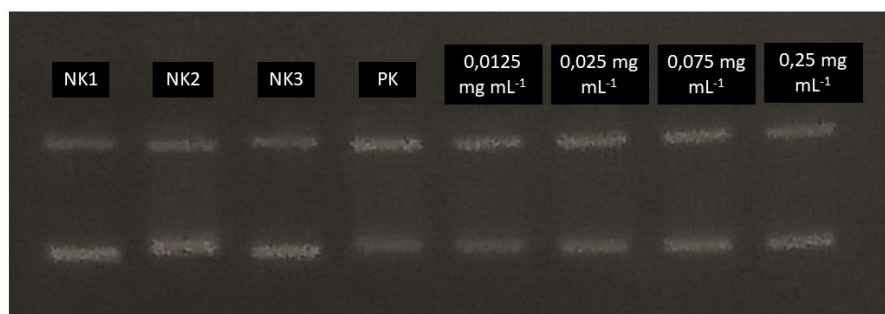
Kod Cal27 stanica, ekstrakt dobričice nije pokazao statistički značajan ($p>0,05$) utjecaj, u odnosu na kontrolu, na indukciju slobodnih radikala nakon 2 sata tretmana u svim ispitivanim koncentracijama. Nakon 24 sata tretmana, niže koncentracije ($0,0125$ i $0,025$ mg mL⁻¹) pokazale su antioksidacijsko djelovanje, a više ($0,075$ i $0,25$ mg mL⁻¹) prooksidacijsko djelovanje. Statistički značajan ($p<0,05$) rast razine slobodnih radikala, odnosno prooksidacijsko djelovanje, u odnosu na kontrolu, nakon 2 sata tretmana na HepG2 stanicama uočeno je kod svih koncentracija, izuzev najniže ($0,0125$ mg mL⁻¹). Nakon 24 sata tretmana uočen je suprotan odnos – prooksidacijsko djelovanje uočeno je kod najniže koncentracije ($0,0125$ mg mL⁻¹), dok preostale koncentracije nisu pokazale statistički značajan ($p>0,05$) utjecaj na indukciju slobodnih radikala. Kod AGS stanica, nakon 2 sata tretmana statistički značajno ($p<0,001$) prooksidacijsko djelovanje uočeno je jedino kod koncentracije od $0,075$ mg mL⁻¹, dok je nakon 24 sata tretmana detektirano statistički značajno prooksidacijsko djelovanje ($p<0,05$) kod svih koncentracija, izuzev najniže ($0,0125$ mg mL⁻¹). Vidljivo je da produljenjem tretmana AGS stanica na 24 sata, indukcija slobodnih radikala postaje izraženija, u odnosu na tretman od 2 sata, pri svim ispitivanim koncentracijama. Nakon 2 sata tretmana Caco-2 stanica, statistički značajno prooksidacijsko djelovanje ($p<0,05$) uočeno je kod koncentracija od $0,025$ i $0,075$ mg mL⁻¹, dok je nakon 24 sata prooksidacijsko djelovanje uočeno jedino kod koncentracije od $0,025$ mg mL⁻¹, a antioksidacijsko kod najviše ispitivane koncentracije ($0,25$ mg mL⁻¹).

4.5.4. Određivanje antioksidacijskog i prooksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na modelnoj DNK

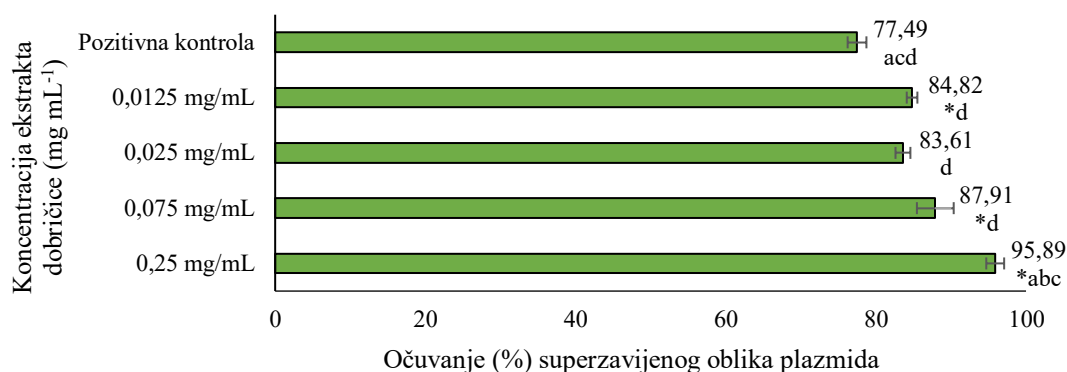
Određivanje potencijalnog genoprotektivnog učinka ekstrakta dobričice provedeno je pomoću plazmida phiX174 RF1 DNA pri čemu se pratilo očuvanje superzavijenog oblika plazmida. Rezultati su prikazani na Slikama 35 i 36.

Osim djelovanju ekstrakta, plazmid je bio izložen djelovanju hidrosilnih radikala nastalih djelovanjem UV zračenja na H₂O₂. Nakon tretmana provedena je agarozna elektroforeza te su dobivene vrpce vizualizirane bojanjem gela u otopini etidij bromida (Slika 35). Ukoliko nastupi oštećenje DNK, plazmid mijenja konformaciju iz superzavijenog oblika u relaksirani zbog čega posljedično putuje sporije u gelu.





Slika 35. Vizualizacija vrpce plazmida phiX174 RF1 DNA na agaroznom gelu



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test. *-statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); d-statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$).

Slika 36. Genotoksični/protektivni učinak ekstrakta dobričice na modelni plazmid phiX174 RF1 DNA

Iz rezultata prikazanih na Slici 35 vidljivo je da je u negativnim kontrolama NK1, NK2 i NK3 veći dio plazmida bio u superzavijenom obliku što je uočljivo iz značajno jačeg intenziteta vrpce superzavijenog plazmida u usporedbi s relaksiranim plazmidom. Nasuprot tome, u pozitivnoj kontroli PK, relaksirani oblik plazmida je izraženiji s jačim intenzitetom u usporedbi sa superzavijenim oblikom. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da izlaganje plazmida samo UV zračenju ili samo H₂O₂ ne dovodi do značajnog oštećenja DNK, za razliku od sinergističkog učinka ova dva agensa koji rezultira puno jačim signalom relaksiranog oblika. U skladu s navedenim, uzeta je srednja vrijednost intenziteta vrpce triju negativnih kontrola i smatrana jednom vrijednošću koja je predstavljala 100 % očuvanja superzavijenog oblika plazmida. Sve ispitivane koncentracije ekstrakta dobričice, izuzev 0,025 mg mL⁻¹, pokazale su statističku značajnu ($p < 0,05$) zaštitu od oštećenja genetskog materijala u usporedbi s

pozitivnom kontrolom. Najizraženiji genoprotektivni učinak postignut je pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) uz 95,89 % očuvanja superzavijenog oblika plazmida.

4.5.5. Određivanje genotoksičnog i genoprotektivnog učinka ekstrakta dobričice na staničnom genetičkom materijalu

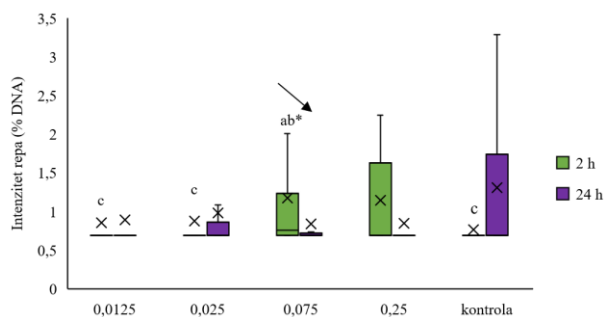
Rezultati ispitivanja učinka ekstrakta dobričice na DNK, provedenog komet testom na kontinuiranim humanim staničnim linijama Cal27, HepG2, AGS i Caco-2, prikazani su na Slikama 37 i 38 u obliku kutijastog dijagrama. U svrhu lakše obrade dobivenih rezultata, podaci su normalizirani prirodnim logaritmom.

Tijekom tretmana od 2 sata, jedino je koncentracija od $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ rezultirala statistički značajnim povećanjem ($p < 0,05$) intenziteta repa i repnog momenta u Cal27 stanicama, dok kod produženog tretmana od 24 sata nisu uočene statistički značajne ($p > 0,05$) promjene između cijelog koncentracijskog raspona. U slučaju HepG2 stanica, ista koncentracija od $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ uzrokovala je također statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje intenziteta repa i repnog momenta tijekom tretmana od 2 sata, ali oštećenje genetičkog materijala uočeno je i kod najniže ispitivane koncentracije od $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$. Nadalje, ni genotoksični ni genoprotektivni učinak ($p > 0,05$) ekstrakta dobričice nije uočen kod AGS stanica, bez obzira na vrijeme tretmana. Slično je uočeno i kod Caco-2 stanica – bez statistički značajnih promjena ($p > 0,05$) u genetičkom materijalu u usporedbi s kontrolom, ali uočeno je statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) intenziteta repa i repnog momenta povećanjem koncentracije ekstrakta dobričice od $0,0125$ na $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$. U usporedbi s rezultatima određivanja antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta dobričice na modelnoj DNK (poglavlje 4.5.4.) kojima je utvrđeno da se protektivni učinak povećava s porastom koncentracije ekstrakta, ispitivanjem istog učinka na staničnom genetičkom materijalu, ta ovisnost nije utvrđena.

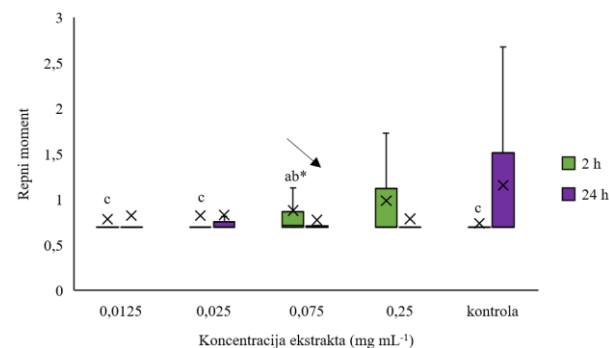
Statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) intenziteta repa i repnog momenta s povećanjem vremena tretmana od 2 na 24 sata uočeno je kod Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 stanica, redom kod koncentracija od $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$.



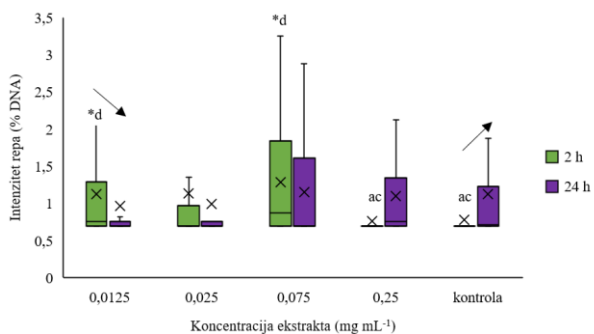
a)



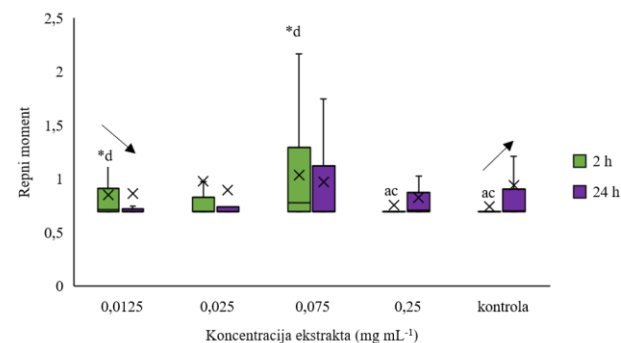
b)



c)



d)

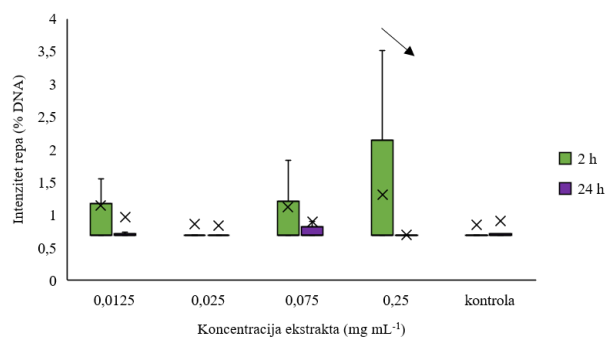


Statistička obrada rezultata unutar istog vremena tretmana (2 ili 24 h) provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); d-statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$). Statistička obrada rezultata unutar iste koncentracije kroz različito vrijeme tretmana (2 i 24 sata) provedena je koristeći Mann-Whitney U test. Statistički značajna promjena ($p < 0,05$) označena je strelicom (→, pad ili rast ovisno o smjeru strelice).

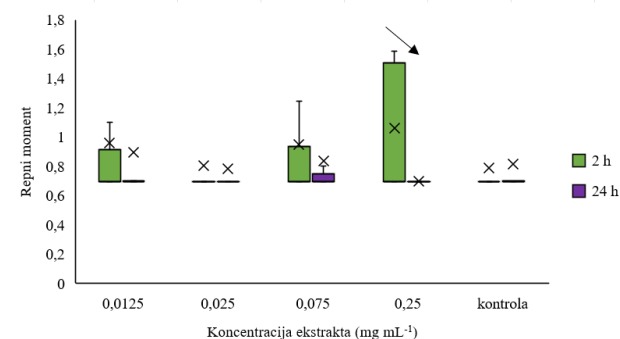
Slika 37. Utjecaj ekstrakta dobičice na intenzitet repa i repni moment u Cal27 (a i b) i HepG2 (c i d) stanicama



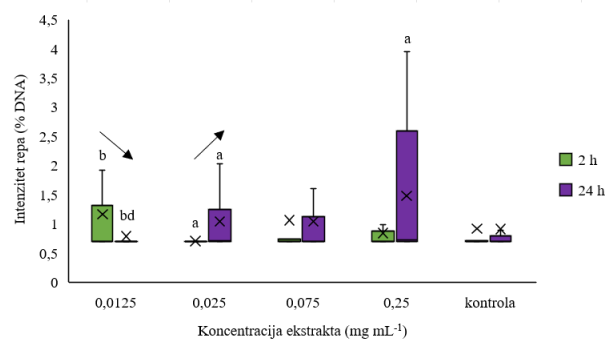
a)



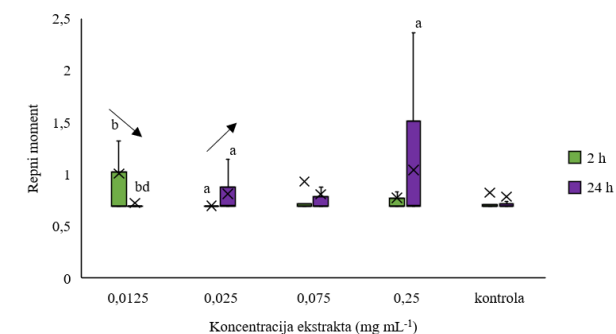
b)



c)



d)



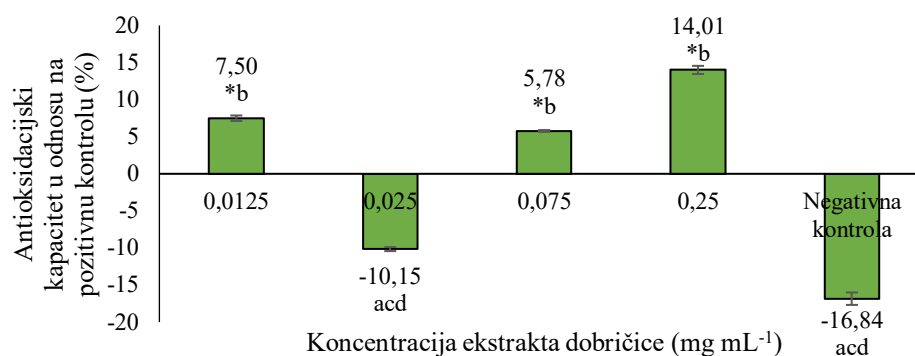
Statistička obrada rezultata unutar istog vremena tretmana (2 ili 24 h) provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); d-statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$). Statistička obrada rezultata unutar iste koncentracije kroz različito vrijeme tretmana (2 i 24 sata) provedena je koristeći Mann-Whitney U test. Statistički značajna promjena ($p < 0,05$) označena je strelicom (→, pad ili rast ovisno o smjeru strelice).

Slika 38. Utjecaj ekstrakta dobričice na intenzitet repa i repni moment u AGS (a i b) i Caco-2 (c i d) stanicama



4.5.6. Određivanje antioksidacijskog i prooksidacijskog učinka ekstrakta dobričice na albuminu iz govedeg seruma

Antioksidacijski kapacitet različitih koncentracija ekstrakta dobričice na modelnom proteinu albuminu iz govedeg seruma prikazan je kao postotak antioksidacijskog kapaciteta određene koncentracije ekstrakta u odnosu na antioksidacijski kapacitet pozitivne kontrole (Trolox), na Slici 39.



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test. *-statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 0,0125 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 0,025 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 0,075 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$); d-statistički značajna razlika u odnosu na 0,25 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$).

Slika 39. Utjecaj ekstrakta dobričice na oksidaciju modelnog proteina

Najznačajnije antioksidacijsko djelovanje, 14,01 % više od pozitivne kontrole, postignuto je s najvišom ispitivanom koncentracijom ekstrakta od 0,25 mg mL⁻¹, dok je koncentracija od 0,025 mg mL⁻¹ jedina rezultirala prooksidacijskim učinkom.

4.6. Karakterizacija bioloških učinaka ekstrakta dobričice *in vivo*

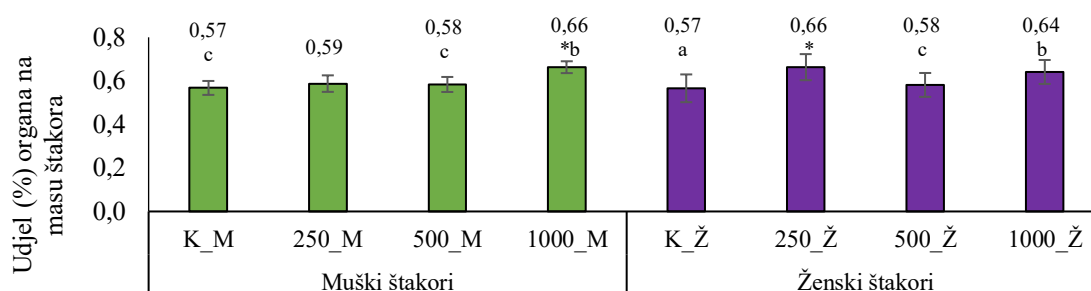
Kao i u slučaju *in vitro* analiza, uzorak D3 korišten je za *in vivo* analize. Ekstrakt je pripremljen koristeći optimalne parametre HAE tehnike (poglavlje 4.2.1.).

U svrhu određivanja utjecaja ekstrakta dobričice na parametre oksidacijskog stresa i genotoksičnosti u *in vivo* uvjetima korišteni su štakori soja Sprague Dawley. Određeni su intenziteti karbonilacije proteina i lipidne peroksidacije, aktivnost endogenog enzimatskog antioksidansa superoksid dismutaze, te koncentracija neenzimatskog endogenog antioksidansa glutaciona, u homogenatima bubrega, slezene i jetre.



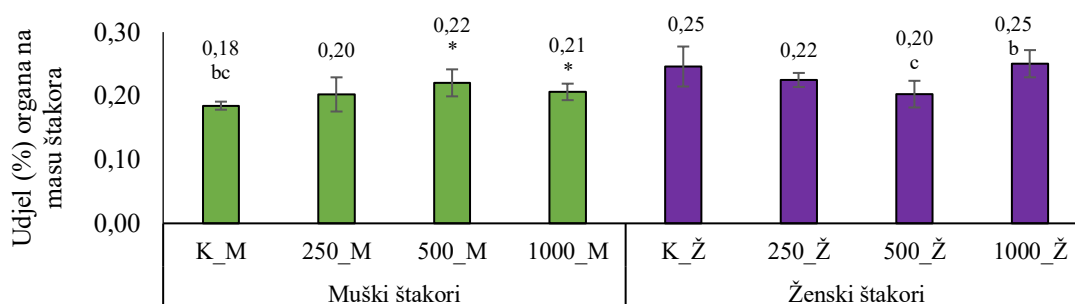
4.6.1. Određivanje udjela organa u masi štakora

Udjeli bubrega, slezene i jetre na masu štakora prikazani su na Slikama 40 – 42.



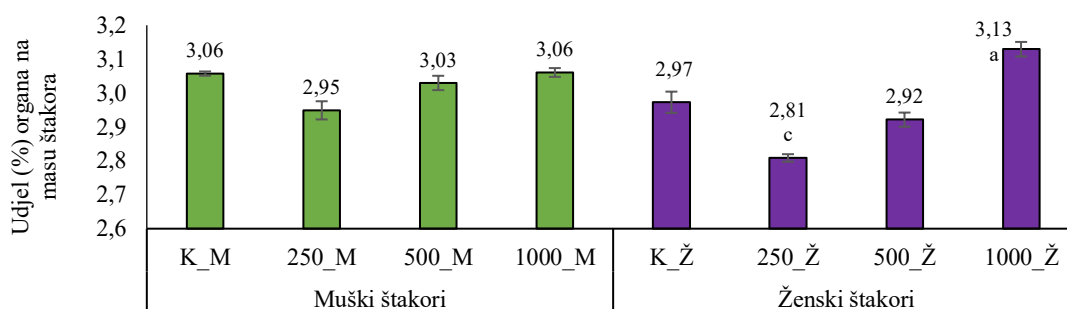
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 40. Udjel (%) bubrega u ukupnoj masi štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 41. Udjel (%) slezene u ukupnoj masi štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 42. Udjel (%) jetre u ukupnoj masi štakora



Tretman muških štakora ekstraktom dobričice u koncentraciji od 1000 mg kg⁻¹ uzrokovao je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje bubrega u odnosu na kontrolu, dok je kod ženskih štakora isti učinak uzrokovao tretman koncentracijom ekstrakta od 250 mg kg⁻¹. Tretman muških štakora koncentracijama ekstrakta dobričice od 500 i 1000 mg kg⁻¹ uzrokovao je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje slezene u odnosu na kontrolu, dok kod ženskih štakora tretman ekstraktom nije uzrokovao statistički značajne promjene ($p > 0,05$). Tretman ekstraktom dobričice nije uzrokovao statistički značajne promjene ($p > 0,05$) u masi jetre muških i ženskih štakora.

4.6.2. Određivanje udjela proteina u homogenatima organa

Udjel proteina u homogenatima bubrega, slezene i jetre testnih i kontrolnih skupina muških i ženskih štakora prikazan je u Tablici 31.

Tablica 31. Udjel (mg mL⁻¹) proteina u homogenatima bubrega, slezene i jetre

<i>Muški štakori</i>			
Skupina	Bubrezi	Slezena	Jetra
K_M	11,38 ± 1,23	11,28 ± 1,02	15,07 ± 1,51
250_M	9,96 ± 1,12	13,38 ± 1,42	16,43 ± 2,49
500_M	11,74 ± 2,23	12,81 ± 0,46	18,22 ± 2,60
1000_M	10,17 ± 1,52	12,92 ± 0,46	15,90 ± 5,72
<i>Ženski štakori</i>			
Skupina	Bubrezi	Slezena	Jetra
K_Ž	13,09 ± 1,81	10,92 ± 1,78	14,34 ± 1,26
250_Ž	10,25 ± 1,37	12,43 ± 2,19	12,66 ± 0,59
500_Ž	10,87 ± 0,79	10,17 ± 2,17	15,45 ± 0,96
1000_Ž	9,49 ± 1,19	10,38 ± 2,17	15,32 ± 2,46

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije.

4.6.3. Određivanje biokemijskih i hematoloških parametara krvi

Biokemijski parametri krvi testnih i kontrolnih skupina muških i ženskih štakora prikazani su u Tablicama 32 i 33, a hematološki parametri u Tablici 34.



Tablica 32. Rezultati biokemijskih pretraga krvi muških štakora

	K_M	250_M	500_M	1000_M
Ukupni proteini (g L ⁻¹)	56,50±1,50 ^{ac}	65,00±2,16 [*]	64,00±4,00	67,50±2,50 [*]
AST (U L ⁻¹)	119,00±37,00	104,33±29,96	99,00±12,00	94,00±5,00
ALT (U L ⁻¹)	62,00±23,00	56,33±10,27	54,50±4,50	56,00±1,00
LDH (U L ⁻¹)	184,50±9,50	167,33±5,19	186,00±8,03	182,50±12,50
Glukoza (mmol L ⁻¹)	5,50±0,65	6,27±1,06	6,88±1,18	5,68±1,17
Bilirubin ukupni (μmol L ⁻¹)	1,83±0,12	1,83±0,21	1,50±1,00	1,70±0,10
Urea (mmol L ⁻¹)	5,85±0,45	6,40±0,94	6,20±0,50	6,00±0,30
Kreatinin (μmol L ⁻¹)	28,50±0,50	29,00±0,00	28,50±3,50	27,50±3,50

Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M ($p<0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M ($p<0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M ($p<0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M ($p<0,05$).

Tablica 33. Rezultati biokemijskih pretraga krvi ženskih štakora

	K_Ž	250_Ž	500_Ž	1000_Ž
Ukupni proteini (g L ⁻¹)	63,67±3,30 ^c	68,50±7,50	70,50±3,84	72,00±5,15 [*]
AST (U L ⁻¹)	81,33±2,87 ^{ab}	112,00±1,00 ^{*c}	112,00±8,51 ^{*c}	86,75±3,56 ^{ab}
ALT (U L ⁻¹)	45,00±6,48 ^b	52,00±7,00	60,50±3,20 ^{*c}	47,25±3,56 ^b
LDH (U L ⁻¹)	155,33±11,06	190,07±12,00	185,75±7,63	182,75±9,74
Glukoza (mmol L ⁻¹)	5,50±0,70	5,19±1,52	4,53±0,86	4,33±0,55
Bilirubin ukupni (μmol L ⁻¹)	1,40±0,40	1,60±0,60	1,73±0,18	1,75±0,57
Urea (mmol L ⁻¹)	5,00±0,14 ^{bc}	5,80±0,50	5,98±0,33 [*]	6,10±1,06 [*]
Kreatinin (μmol L ⁻¹)	31,67±2,05	27,00±4,00	32,75±2,49	30,50±3,04

Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_Ž ($p<0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_Ž ($p<0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_Ž ($p<0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_Ž ($p<0,05$).



Tablica 34. Rezultati hematoloških pretraga krvi muških i ženskih štakora

	K_M	250_M	500_M	1000_M
Leukociti (*10 ⁹ L ⁻¹)	3,30±0,10 ^{bc}	7,57±2,84	10,00±0,51*	9,57±1,68*
Neutrofilni granulociti (%)	25,80±2,80 ^{bc}	18,10±1,10 ^c	17,60±2,06*	13,80±1,53 ^a
Limfociti (%)	70,85±2,95 ^{ac}	80,67±0,74*	79,27±3,18 ^c	84,90±1,53 ^b
Monociti (%)	1,10±0,20 ^{ac}	0,77±0,17*	0,97±0,12	0,73±0,29*
Eozinofilni granulociti (%)	1,95±0,05 ^{ac}	0,40±0,29 ^b	2,03±1,19 ^{ac}	0,27±0,17 ^b
Bazofilni granulociti (%)	0,30±0,00 ^{ab}	0,10±0,00 ^c	0,13±0,05*	0,29±0,09 ^a
Eritrociti (*10 ¹² L ⁻¹)	8,17±0,23 ^{abc}	8,77±0,24*	8,95±0,29*	8,81±0,31*
Hemoglobin (g L ⁻¹)	144,50±4,50 ^{bc}	154,67±6,80	155,67±3,68*	155,00±3,74*
Hematokrit (L L ⁻¹)	0,45±0,02 ^{bc}	0,48±0,02	0,49±0,01*	0,49±0,01*
MCV (fL)	54,85±0,55	55,23±1,99	54,63±1,13	55,70±0,60
MCH (pg)	17,65±0,05	17,63±0,59	17,40±0,36	17,57±0,25
MCHC (g L ⁻¹)	322,50±2,50 ^a	319,33±2,87 ^c	318,67±1,25	319,00±0,82 ^a
RDW (%)	14,20±0,80 ^{ac}	15,47±0,74*	15,03±0,54	15,70±0,50*
Trombociti (*10 ⁹ L ⁻¹)	867,50±6,50	919,67±61,54	805,00±171,94	907,67±18,70
MPV (fL)	7,10±0,08 ^{ab}	7,27±0,12*	7,30±0,00*	7,17±0,21
	K_Ž	250_Ž	500_Ž	1000_Ž
Leukociti (*10 ⁹ L ⁻¹)	7,33±0,76	5,80±2,10	6,80±1,69	6,15±0,60
Neutrofilni granulociti (%)	13,97±1,01 ^a	19,00±0,20*	16,35±4,22	18,75±5,67
Limfociti (%)	82,90±1,92	79,60±0,40	78,98±5,22	78,85±5,38
Monociti (%)	0,95±0,29	0,80±0,00	0,73±0,22	1,00±0,19
Eozinofilni granulociti (%)	0,53±0,22 ^b	0,55±0,25 ^b	1,20±0,00 ^{*ac}	0,47±0,20 ^b
Bazofilni granulociti (%)	0,10±0,08	0,10±0,00	0,13±0,04	0,13±0,08
Eritrociti (*10 ¹² L ⁻¹)	7,59±0,30	7,66±0,00	7,73±0,60	7,47±0,39
Hemoglobin (g L ⁻¹)	143,33±4,92	144,00±0,00	144,75±10,83	139,50±5,12
Hematokrit (L L ⁻¹)	0,44±0,02	0,43±0,01	0,44±0,04	0,42±0,02
MCV (fL)	58,30±0,28 ^{abc}	56,50±0,90*	56,90±0,83*	56,40±0,72*
MCH (pg)	18,87±0,12	18,80±0,00	18,70±0,19	18,70±0,32
MCHC (g L ⁻¹)	324,33±3,09 ^{ac}	333,00±6,00*	329,25±3,90	332,00±4,36*
RDW (%)	12,27±0,59 ^a	13,25±0,95*	12,90±0,90	12,83±0,78
Trombociti (*10 ⁹ L ⁻¹)	874,33±48,88	861,00±14,00 ^b	973,75±84,33 ^a	856,25±107,34
MPV (fL)	7,05±0,05 ^{bc}	7,10±0,00 ^{bc}	7,33±0,16 ^{*a}	7,25±0,05 ^{*a}

Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p<0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p<0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p<0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p<0,05$).



Tretman muških i ženskih štakora koncentracijom ekstrakta dobričice od 1000 mg kg⁻¹ uzrokovao je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje koncentracije ukupnih proteina u krvi, dok je kod muških štakora taj efekt uočen i kod koncentracije od 250 mg kg⁻¹. Aktivnost enzima jetre – AST i ALT, nije bila statistički značajno ($p > 0,05$) promijenjena tretmanom ekstrakta kod muških štakora, dok je kod ženskih štakora tretman koncentracijom ekstrakta od 500 mg kg⁻¹ uzrokovao statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje njihovih aktivnosti, a efekt povećanja aktivnosti AST uočen je i kod najniže ispitivane koncentracije od 250 mg kg⁻¹. Nadalje, nije bilo statistički značajne ($p > 0,05$) razlike u aktivnosti LDH te koncentracijama glukoze i bilirubina u krvi muških i ženskih štakora testnih skupina i kontrole. Koncentracije ureje i kreatinina, kao markera bubrežne funkcije, u krvi muških štakora nisu bile statistički značajno ($p > 0,05$) različite između testnih skupina i kontrole. Kod ženskih štakora, tretman ekstraktom dobričice u koncentracijama od 500 i 1000 mg kg⁻¹ uzrokovao je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje koncentracije ureje u krvi u odnosu na kontrolu, dok se koncentracija kreatinina u krvi ženskih štakora nije statistički značajno ($p > 0,05$) razlikovala između skupina.

Kod muških štakora, tretman ekstraktom dobričice u koncentracijama od 500 i 1000 mg kg⁻¹ uzrokovao je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje udjela leukocita, dok kod ženskih štakora nisu uočene značajne razlike između testnih skupina i kontrole. Ekstrakt dobričice pokazao je veći utjecaj na promjenu vrsta leukocita u krvi muških štakora u odnosu na ženske štakore. Kod ženskih štakora, uočeno je jedino statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje udjela neutrofilnih granulocita nakon tretmana koncentracijom od 250 mg kg⁻¹ i povećanje eozinofilnih granulocita nakon tretmana ekstraktom od 500 mg kg⁻¹. Što se tiče muških štakora, koncentracije ekstrakta od 500 i 1000 mg kg⁻¹ uzrokovale su statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje udjela neutrofilnih granulocita, a statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje limfocita te smanjenje monocita i eozinofilnih granulocita detektirano je pri koncentracijama od 250 i 1000 mg kg⁻¹. Koncentracije ekstrakta od 250 i 500 mg kg⁻¹ uzrokovale su i statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje bazofilnih granulocita kod muških štakora.

Koncentracije eritrocita, hemoglobina i hematokrita u krvi ženskih štakora nisu bile statistički značajno ($p > 0,05$) promijenjene uslijed tretmana ekstraktom dobričice, dok je kod muških štakora uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje eritrocita kod svih koncentracija te povećanje koncentracija hemoglobina i hematokrita kod koncentracija od 500 i 1000 mg kg⁻¹. Prosječan volumen eritrocita (MCV) i prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH) nisu bili statistički značajno ($p > 0,05$) različiti između testnih skupina i kontrole muških štakora, dok je koncentracija od 250 mg kg⁻¹ uzrokovala statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje prosječne

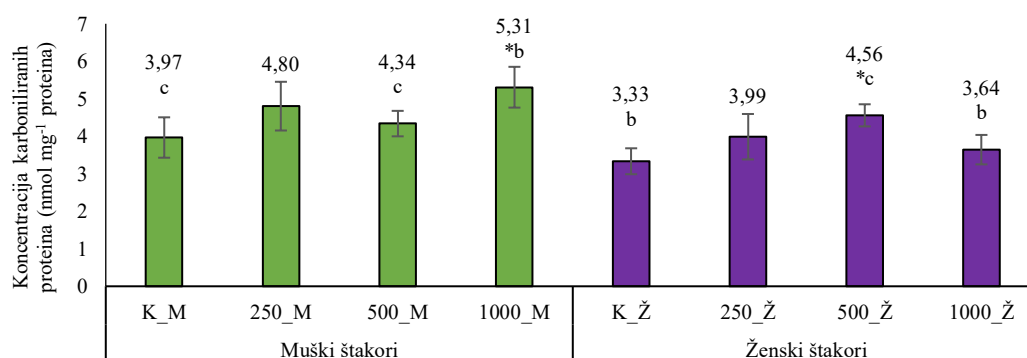


koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) i povećanje raspodjele eritrocita po volumenu (RDW). Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vrijednosti RDW uzrokovala je i koncentracija od 1000 mg kg^{-1} . Kod ženskih štakora, koncentracija od 250 mg kg^{-1} uzrokovala je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje prosječnog volumena eritrocita (MCV) i povećanje prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) i raspodjele eritrocita po volumenu (RDW). Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje MCV vrijednosti uočeno je i kod koncentracija od 500 i 1000 mg kg^{-1} i povećanje MCHC vrijednosti kod 1000 mg kg^{-1} .

Ekstrakt dobričice nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecao na udjel trombocita u krvi muških i ženskih štakora, dok je kod muških štakora uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje prosječnog volumena trombocita (MPV) pri koncentracijama od 250 i 500 mg kg^{-1} , a kod ženskih štakora pri koncentracijama od 500 i 1000 mg kg^{-1} .

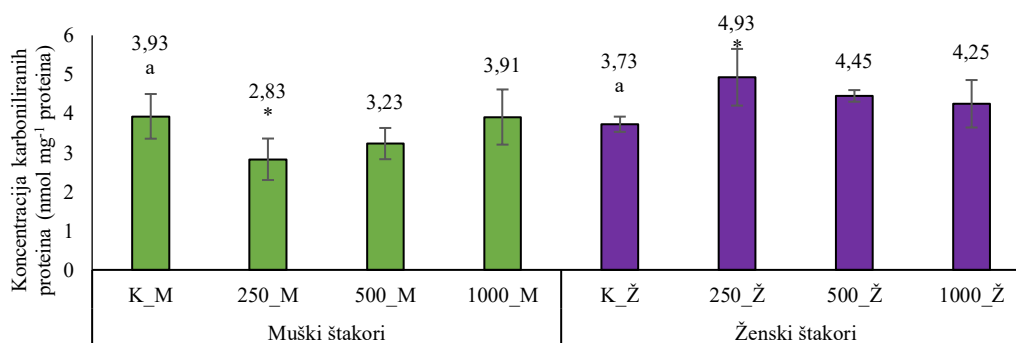
4.6.4. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na koncentraciju karboniliranih proteina organa

Koncentracija karboniliranih proteina bubrega, slezene i jetre testnih i kontrolnih skupina muških i ženskih štakora prikazana je na Slikama 43 – 45.



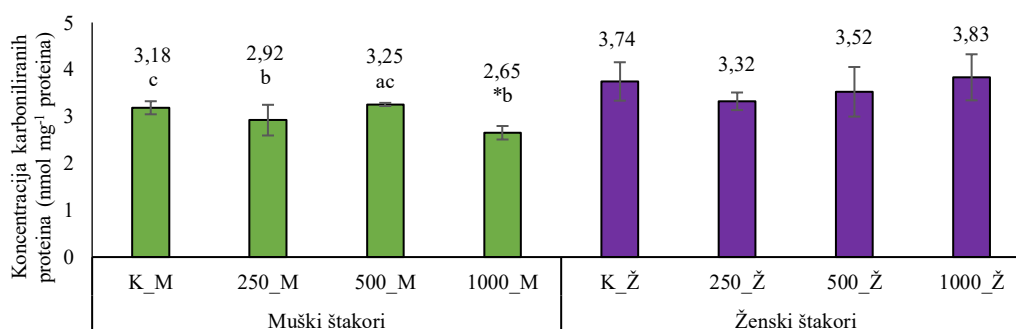
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 43. Koncentracija karboniliranih proteina u bubrezima muških i ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 44. Koncentracija karboniliranih proteina u slezeni muških i ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

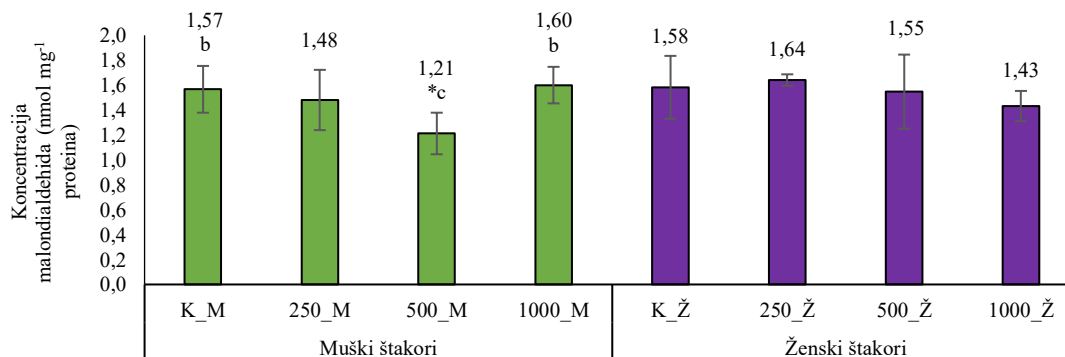
Slika 45. Koncentracija karboniliranih proteina u jetri muških i ženskih štakora

Što se tiče koncentracije karboniliranih proteina u bubrezima testnih i kontrolnih skupina, statistički značajna promjena ($p < 0,05$) u vidu povećanja, u odnosu na kontrolu, kod muških štakora uočena je jedino kod tretmana ekstraktom dobričice od 1000 mg kg⁻¹, a kod ženskih štakora nakon tretmana ekstraktom od 500 mg kg⁻¹. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje koncentracije karboniliranih proteina u slezeni muških štakora uočeno je kod koncentracije ekstrakta od 250 mg kg⁻¹, dok je kod ženskih štakora ista koncentracija uzrokovala statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje. U slučaju jetre, jedina statistički značajna ($p < 0,05$) promjena u vidu smanjenja koncentracije karboniliranih proteina, u odnosu na kontrolu, uočena je kod tretmana muških štakora ekstraktom koncentracije od 1000 mg kg⁻¹.



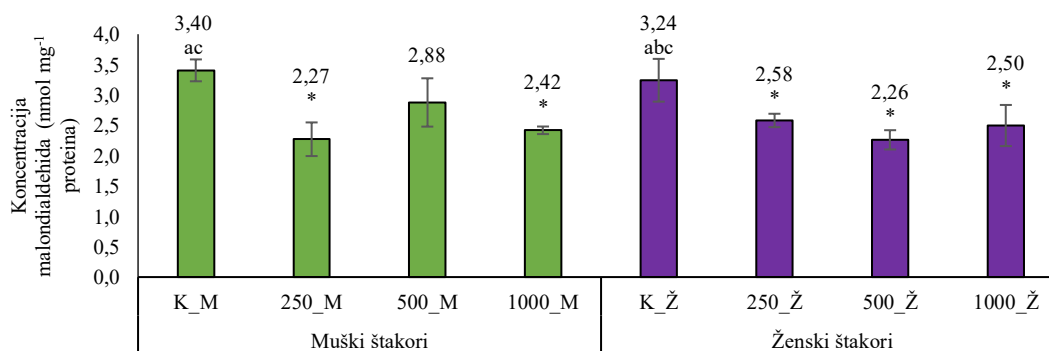
4.6.5. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na intenzitet peroksidacije lipida organa

Intenzitet peroksidacije lipida bubrega, slezene i jetre testnih i kontrolnih skupina muških i ženskih štakora prikazani su na Slikama 46 – 48.



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

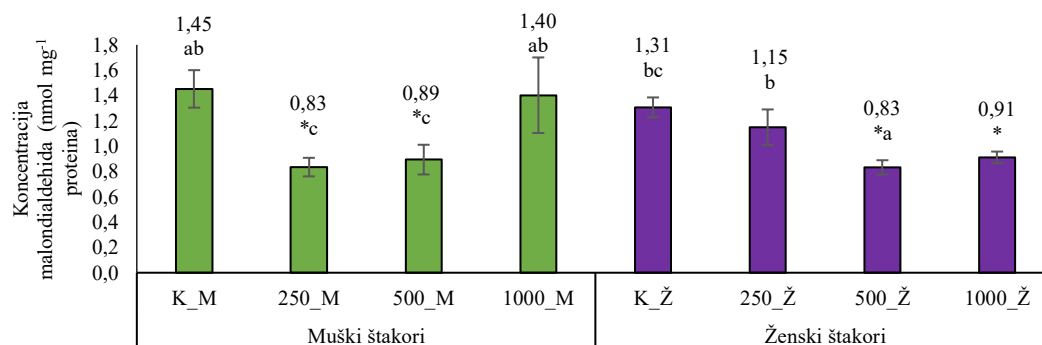
Slika 46. Intenzitet peroksidacije lipida bubrega muških i ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 47. Intenzitet peroksidacije lipida slezene muških i ženskih štakora





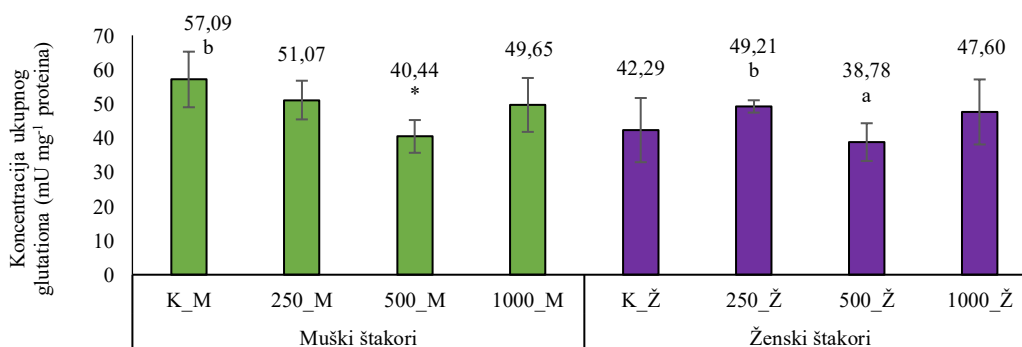
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 48. Intenzitet peroksidacije lipida jetre muških i ženskih štakora

U slučaju intenziteta peroksidacije lipida bubrega, jedino je tretman ekstraktom dobričice od 500 mg kg⁻¹ uzrokovao statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje u odnosu na kontrolu i to isključivo kod muških štakora, dok kod ženskih štakora između testnih skupina i kontrole nije uočena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika. Koncentracije ekstrakta od 250 i 1000 mg kg⁻¹ statistički su značajno ($p < 0,05$) smanjile intenzitet peroksidacije lipida slezene kod muških štakora, a kod ženskih štakora sve ispitivane koncentracije su pokazale isti učinak u vidu statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije jetre muških štakora uočeno je pri koncentracijama od 250 i 500 mg kg⁻¹, a kod ženskih štakora pri koncentracijama od 500 i 1000 mg kg⁻¹.

4.6.6. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na koncentraciju glutaciona u organima

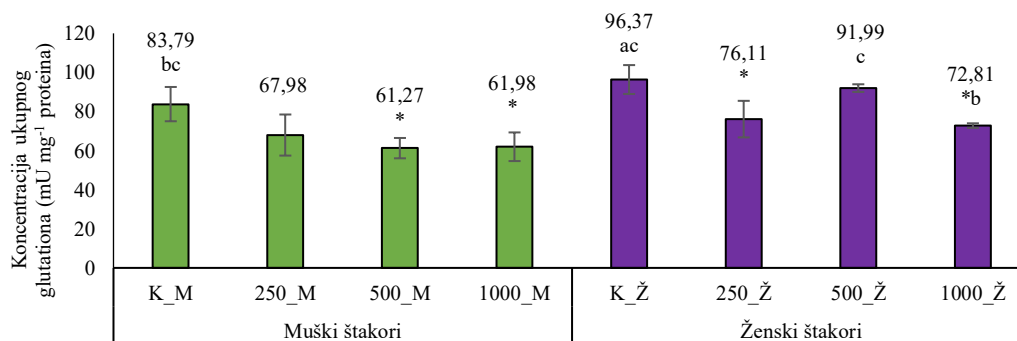
Koncentracija ukupnog glutaciona bubrega, slezene i jetre testnih i kontrolnih skupina muških i ženskih štakora prikazani su na Slikama 49 – 51.



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

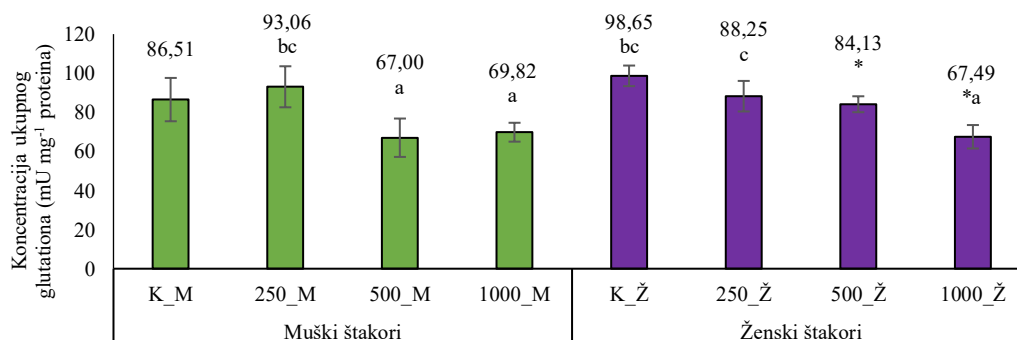
Slika 49. Koncentracija ukupnog glutaciona u bubrezima muških i ženskih štakora





Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 50. Koncentracija ukupnog glutatona u slezeni muških i ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

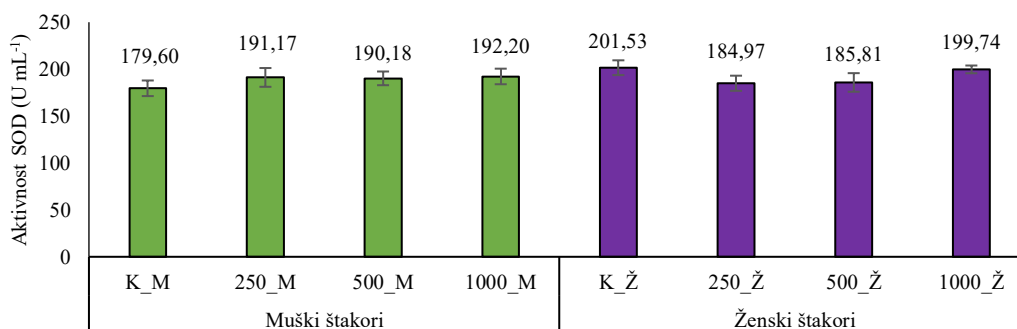
Slika 51. Koncentracija ukupnog glutatona u jetri muških i ženskih štakora

Prema rezultatima za bubrege, vidljivo je da je jedino tretman muških štakora ekstraktom dobričice od 500 mg kg⁻¹ uzrokovao statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje koncentracije ukupnog glutatona u odnosu na kontrolu. Kod ženskih štakora, ekstrakt dobričice nije pokazao statistički značajan ($p > 0,05$) utjecaj na koncentraciju glutatona u bubrezima. Najviša ispitivana koncentracija od 1000 mg kg⁻¹ statistički je značajno ($p < 0,05$) smanjila koncentraciju glutatona u slezeni štakora oba spola, dok je isti učinak kod muških štakora zabilježen i nakon tretmana koncentracijom od 500 mg kg⁻¹, a kod ženskih od 250 mg kg⁻¹. Što se tiče jetre, nije uočena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u koncentraciji glutatona između testnih i kontrolnih skupina muških štakora, dok je kod ženskih štakora uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje nakon tretmana koncentracijama ekstrakta od 500 i 1000 mg kg⁻¹.



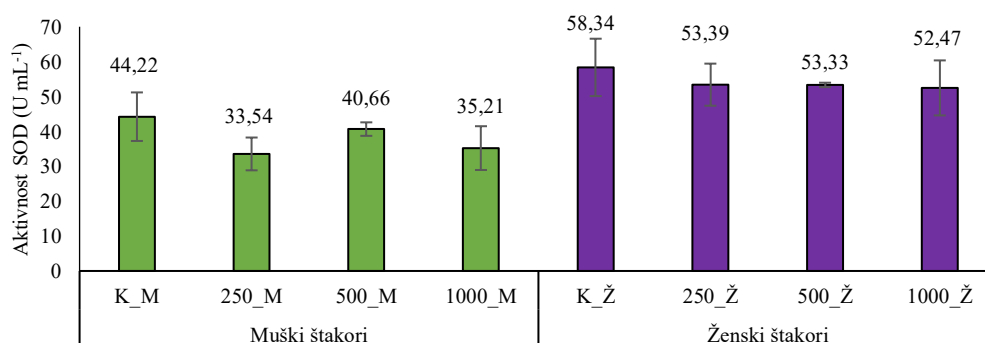
4.6.7. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na aktivnost superoksid dismutaze u organima

Aktivnost superoksid dismutaze bubrega, slezene i jetre testnih i kontrolnih skupina muških i ženskih štakora prikazana je na Slikama 52 – 54.



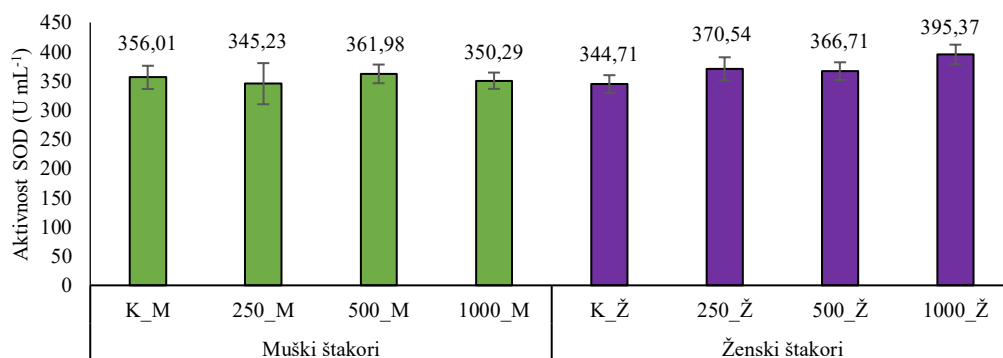
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 52. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) bubrega muških i ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 53. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) slezene muških i ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

Slika 54. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) jetre muških i ženskih štakora

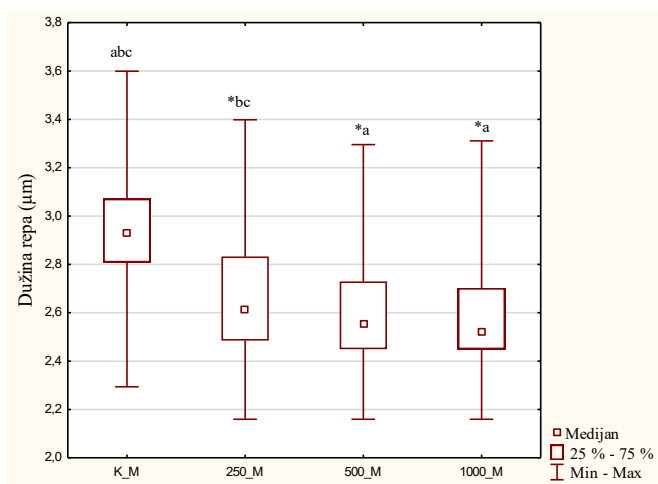
Prema rezultatima određivanja aktivnosti superoksid dismutaze bubrega, slezene i jetre testnih i kontrolnih skupina muških i ženskih štakora, vidljivo je da ni jedna od ispitivanih koncentracija ekstrakta dobričice nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecala na promjenu aktivnosti enzima.

4.6.8. Određivanje utjecaja ekstrakta dobričice na parametre genotoksičnosti u krvi i organima

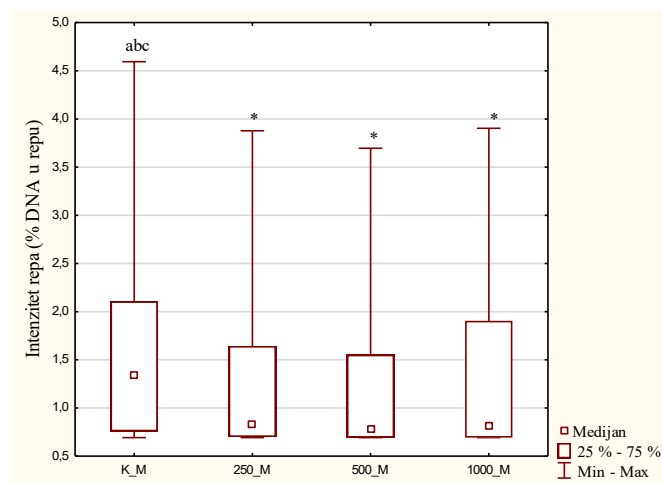
Parametri genotoksičnosti (dužina repa i intenzitet repa DNK) krvi, bubrega, slezene i jetre testnih i kontrolnih skupina štakora prikazani su na Slikama 55 – 58 u obliku kutijastih dijagrama. U svrhu lakše obrade dobivenih rezultata, podaci su normalizirani prirodnim logaritmom.

Ekstrakt dobričice je u svim ispitivanim koncentracijama (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹) rezultirao statistički značajnim ($p < 0,05$) smanjenjem dužine i intenziteta repa DNK, u odnosu na kontrolu, kod oba spola štakora u krvi i svim ispitivanim organima (bubrezi, slezena i jetra). Zanimljivo je istaknuti da je kod muških štakora najniža ispitivana koncentracija ekstrakta od 250 mg kg⁻¹ pokazala jednaki genoprotektivan učinak ($p > 0,05$) slezene, izražen kroz dužinu i intenzitet repa DNK, kao i više ispitivane koncentracije od 500 i 1000 mg kg⁻¹. Isto je detektirano i za intenzitet repa u krvi muških i ženskih štakora.

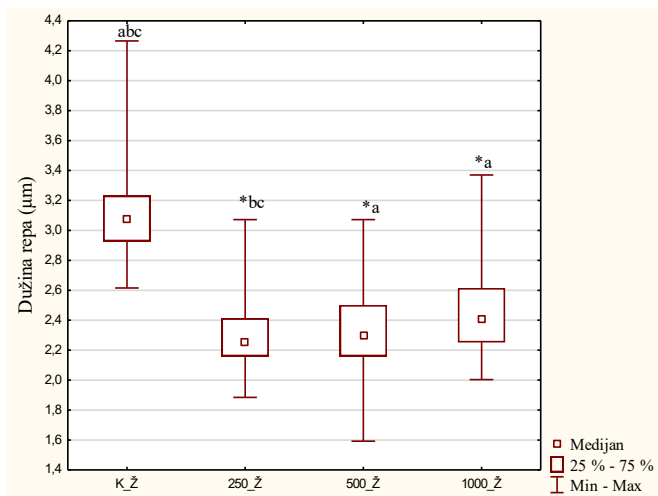
a)



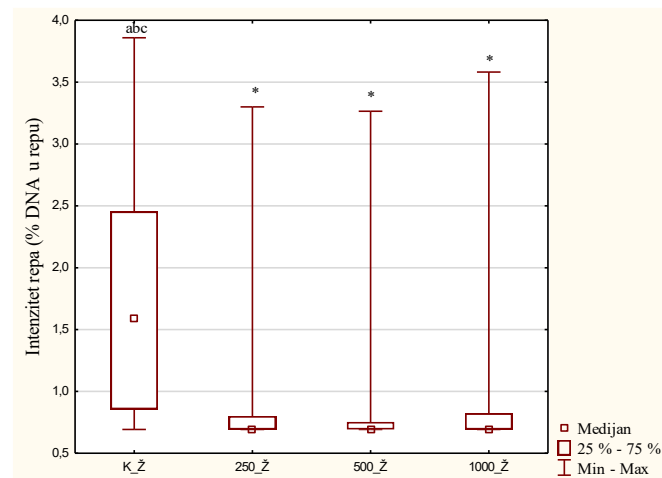
b)



c)



d)

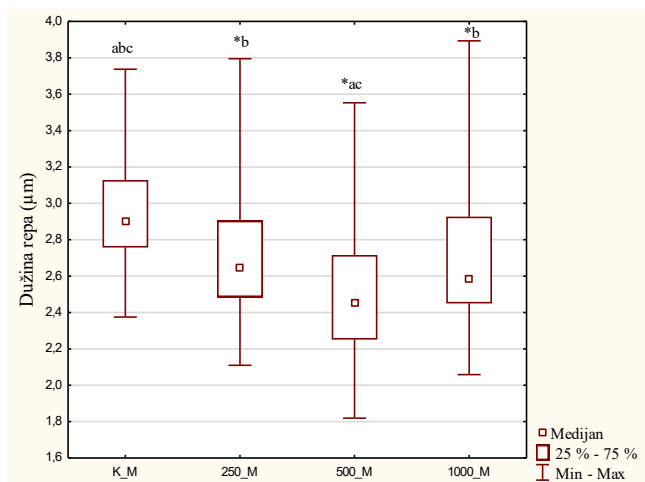


Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

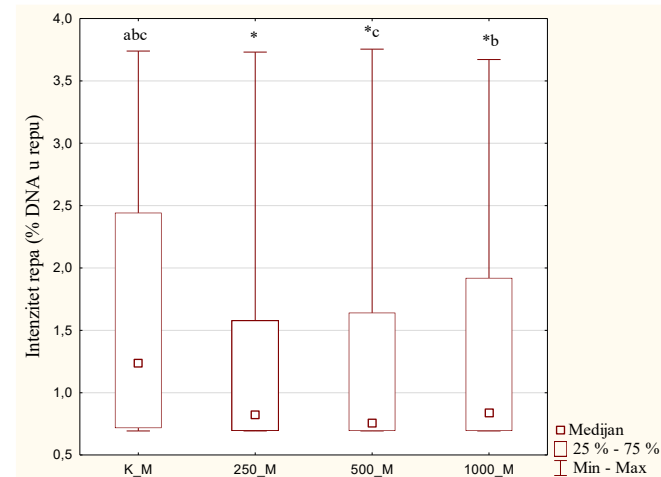
Slika 55. Dužina i intenzitet repa DNK u krvi muških (a i b) i ženskih (c i d) štakora



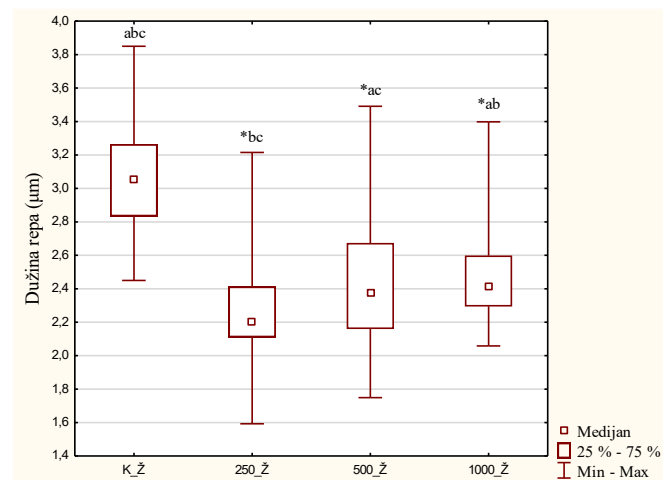
a)



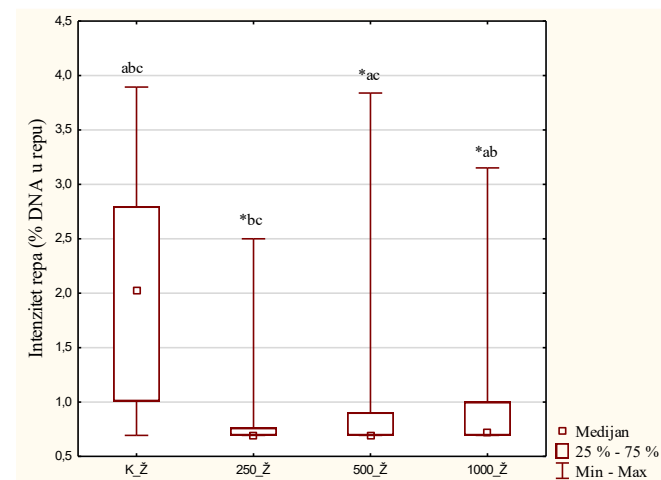
b)



c)



d)

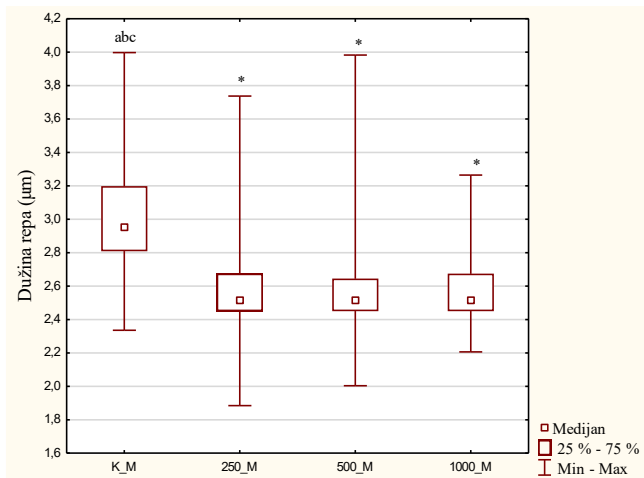


Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

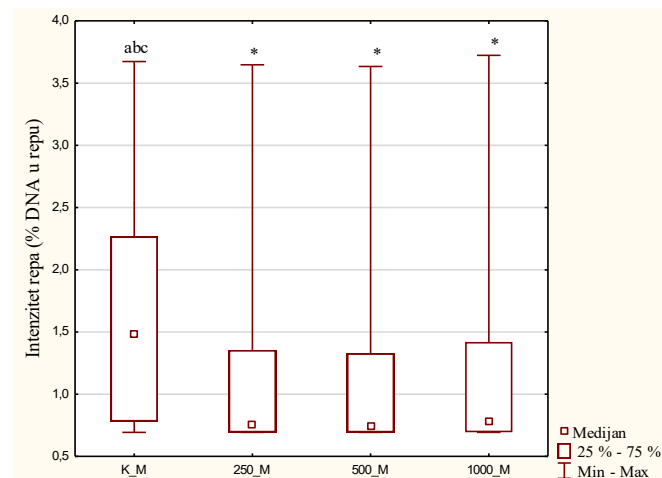
Slika 56. Dužina i intenzitet repa DNK u bubrezima muških (a i b) i ženskih (c i d) štakora



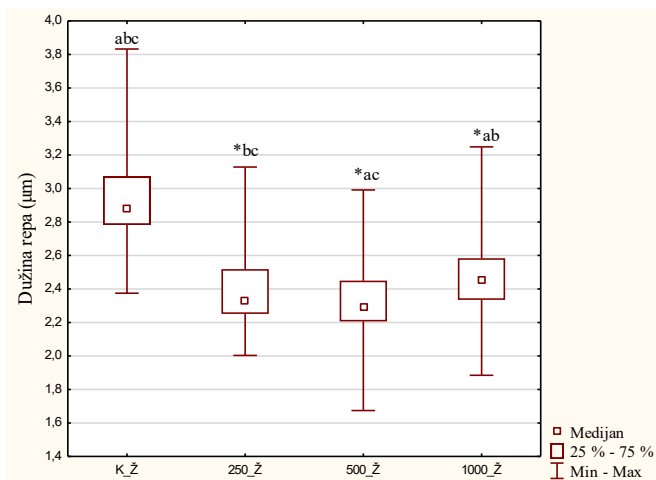
a)



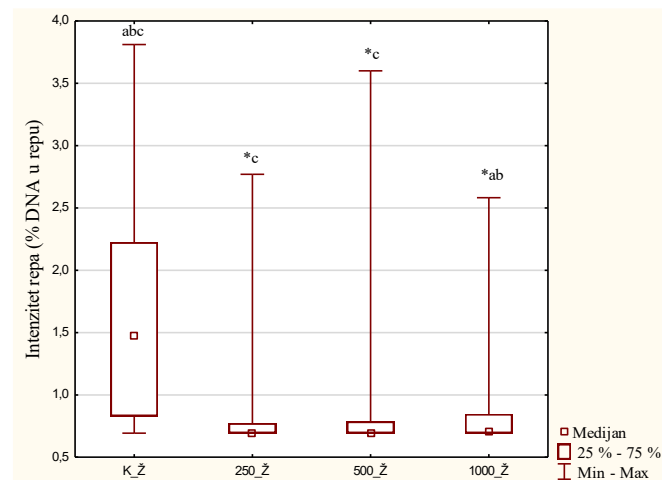
b)



c)



d)

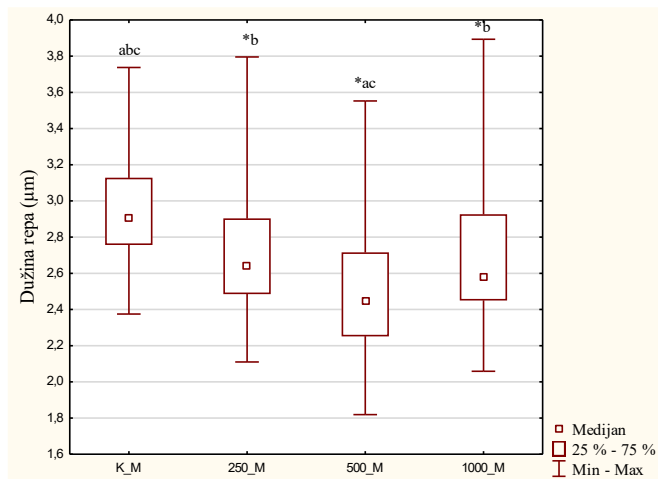


Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

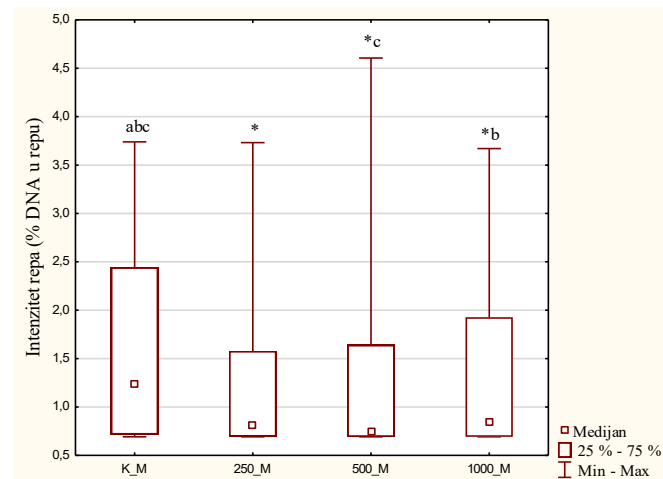
Slika 57. Dužina i intenzitet repa DNK u slezeni muških (a i b) i ženskih (c i d) štakora



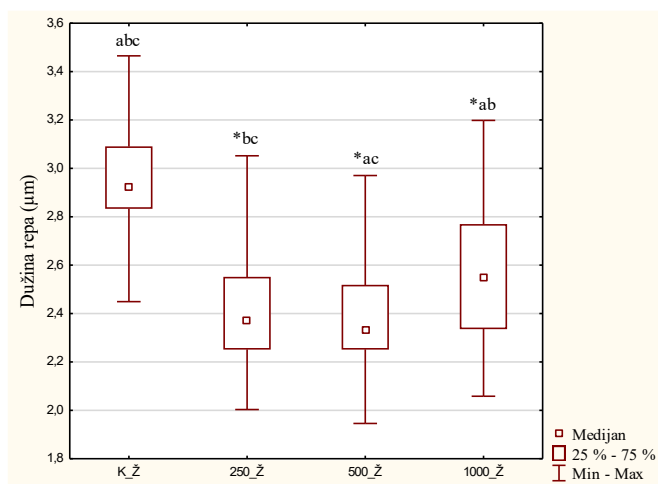
a)



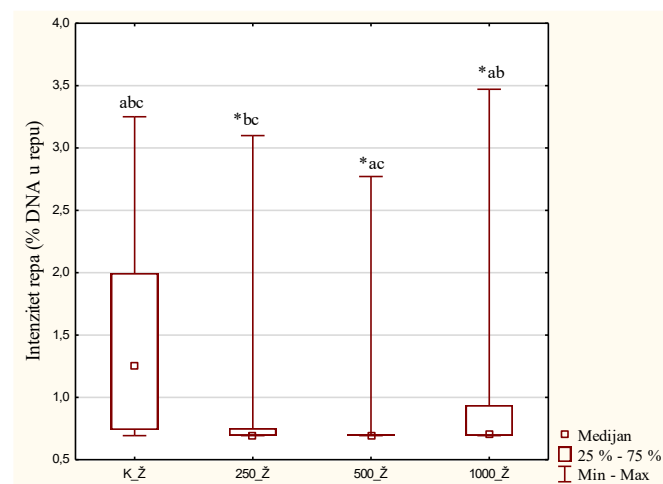
b)



c)



d)



Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na K_M/Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na 250_M/Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na 500_M/Ž ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na 1000_M/Ž ($p < 0,05$).

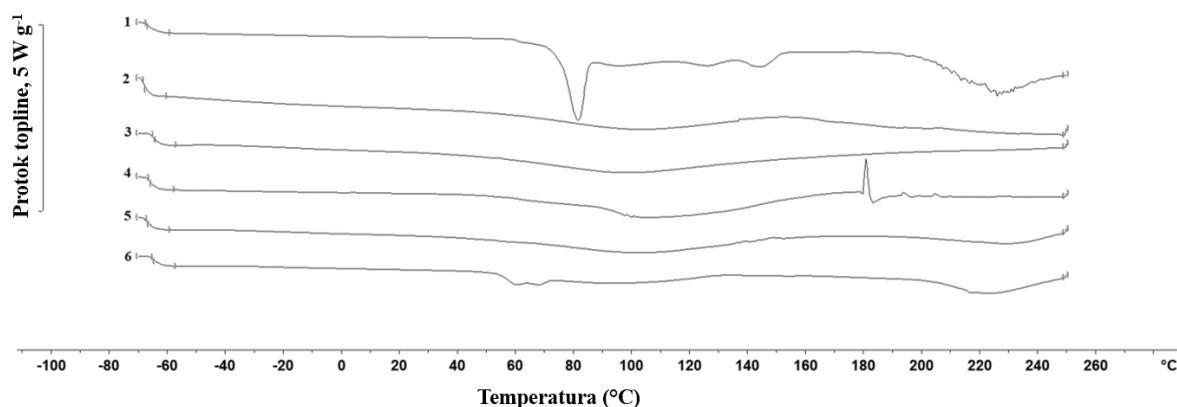
Slika 58. Dužina i intenzitet repa DNK u jetri muških (a i b) i ženskih (c i d) štakora



4.7. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem

4.7.1. Određivanje toplinskih svojstava nosača

U svrhu učinkovite inkapsulacije ekstrakta dobričice sušenjem raspršivanjem provedena je karakterizacija nosača toplinskim analizama (DSC i TGA). DSC termogrami djelomično hidrolizirane guar gume, hidrolizata kolagena, karboksimetil celuloze, nutrioze i mucina prikazani su na Slici 59, a najvažniji parametri DSC analize nosača, iščitani iz istih termograma, prikazani su u Tablici 35. Termogravimetrijske i derivirane termogravimetrijske (DTG) krivulje istih polimera, određene TGA analizom, prikazane su na Slici 60, a određene temperature maksimalne brzine razgradnje u Tablici 35.

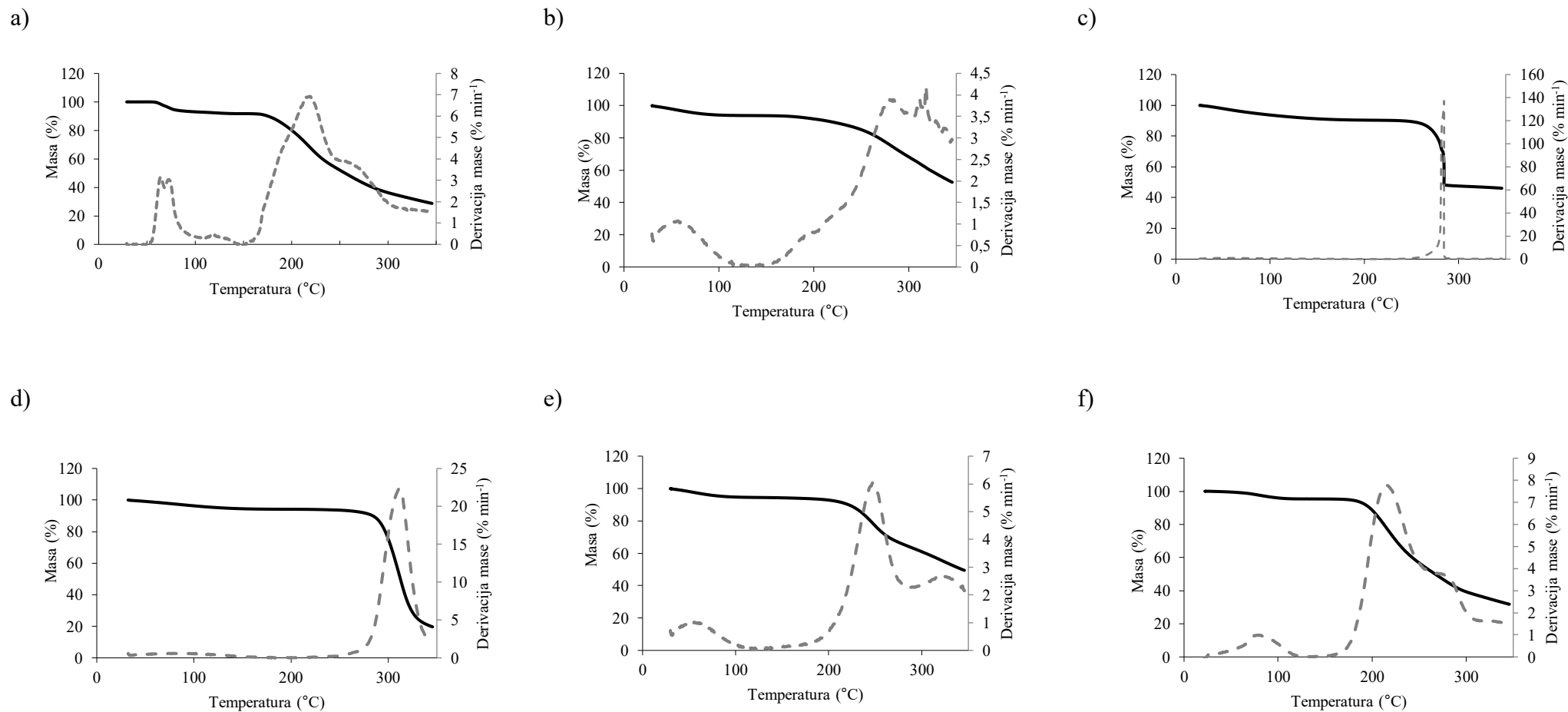


Slika 59. DSC termogrami djelomično hidrolizirane guar gume (1), hidrolizata kolagena (2), karboksimetil celuloze (3), nutrioze (4), mucina (5) i ksilana (6)

Tablica 35. Rezultati DSC (temperatura isparavanja vode (T_i) i specifična entalpija isparavanja vode (ΔH_i)) i TGA (temperatura maksimalne brzine razgradnje (T_{max})) analiza

Uzorak	T_i (°C)	ΔH_i (J g ⁻¹)	T_{max} (°C)
Djelomično hidrolizirana guar guma	82,0	70,4	219,2
Hidrolizat kolagena	/	/	318,0
Karboksimetil celuloza	/	/	284,6
Nutrioza	/	/	310,9
Mucin	/	/	247,1
Ksilan	55,2	15,6	214,7





Slika 60. Termogravimetrijska (—) i derivirana termogravimetrijska (- - -) krivulja djelomično hidrolizirane guar gume (a), hidrolizata kolagena (b), karboksimetil celuloze (c), nutrioze (d), mucina (e) i ksilana (f)

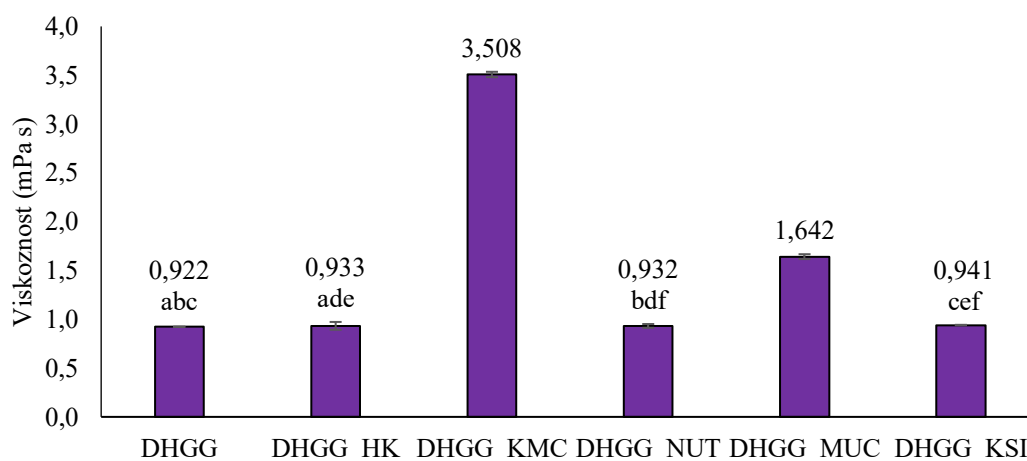


Na DSC termogramima, fenomen toplinskog prijelaza nije uočen ni u jednom uzorku, izuzev isparavanja vode kod djelomično hidrolizirane guar gume i ksilana.

Budući da je sušenje raspršivanjem provedeno na temperaturi od 150 °C, TGA je korišten za određivanje toplinske stabilnosti polimera na toj temperaturi. Kod svih polimera uočen je izrazito mali početni gubitak mase od oko 5 – 10 % na temperaturama ispod 150 °C, što se može pripisati gubitku vezane vode, što je i u skladu s rezultatima DSC analize. Na 150 °C svi polimeri pokazali su toplinsku stabilnost, a najveći gubitak mase započeo je u rasponu od oko 170 – 190 °C za djelomično hidroliziranu guar gumu, hidrolizat kolagena, mucin i ksilan, dok su karboksimetil celuloza i nutrioza pokazale još veću toplinsku stabilnost jer je razgradnja započela na temperaturi od oko 250 °C. Prema maksimalnim vrijednostima krivulja DTG, temperature maksimalne brzine razgradnje za djelomično hidroliziranu guar gumu, hidrolizat kolagena, karboksimetil celulozu, nutriozu, mucin i ksilan bile su redom 219,2 °C, 318,0 °C, 284,6 °C, 310,9 °C, 247,1 °C i 214,7 °C. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da su svi polimeri prikladni kao nosači za sušenje raspršivanjem na temperaturi od 150 °C.

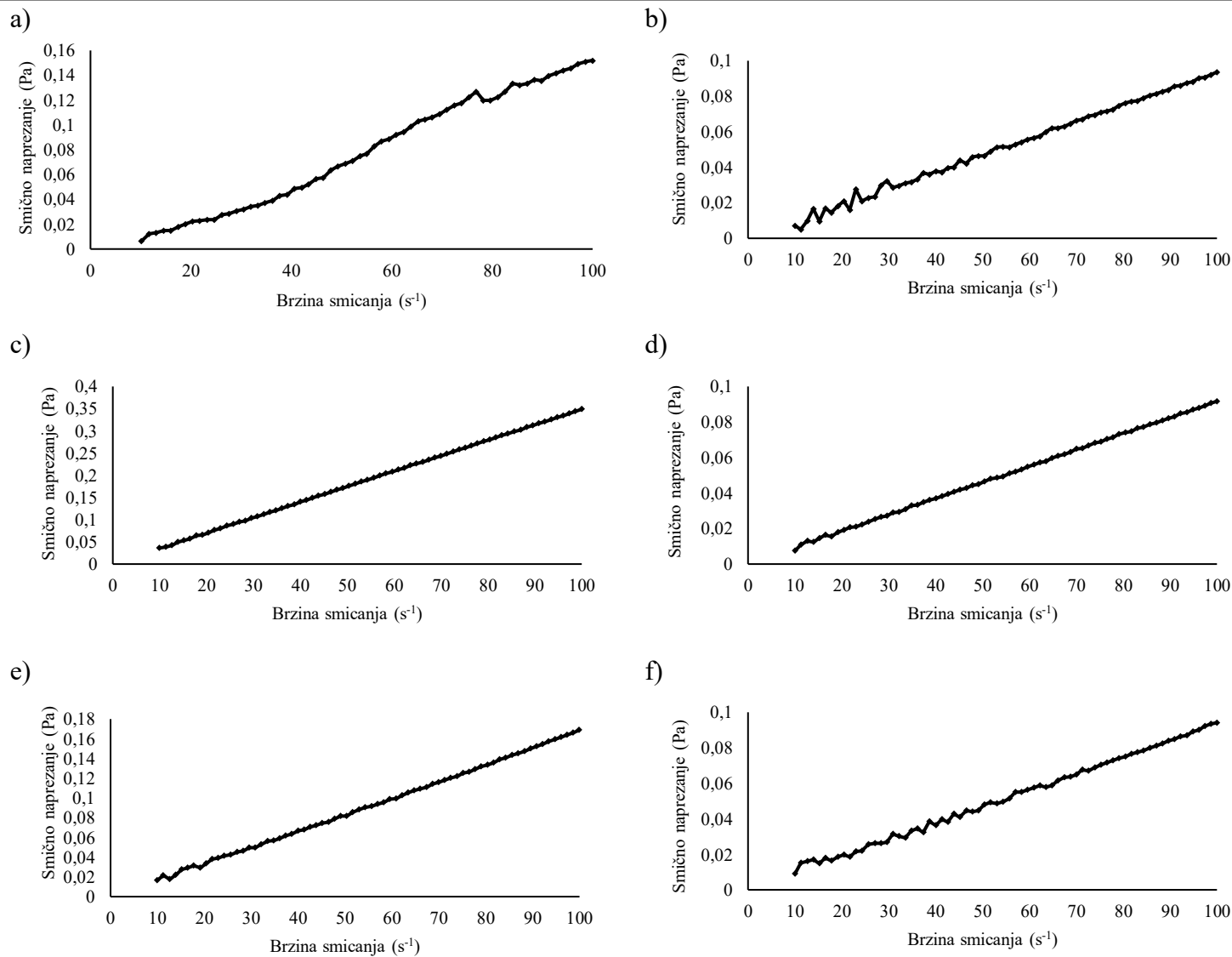
4.7.2. Određivanje viskoznosti otopina nosača

Viskoznost otopina nosača u ekstraktu dobričice korištenih u sušenju raspršivanjem prikazana je na Slici 61, dok su krivulje tečenja i krivulje viskoznosti prikazane su na Slikama 62 i 63.



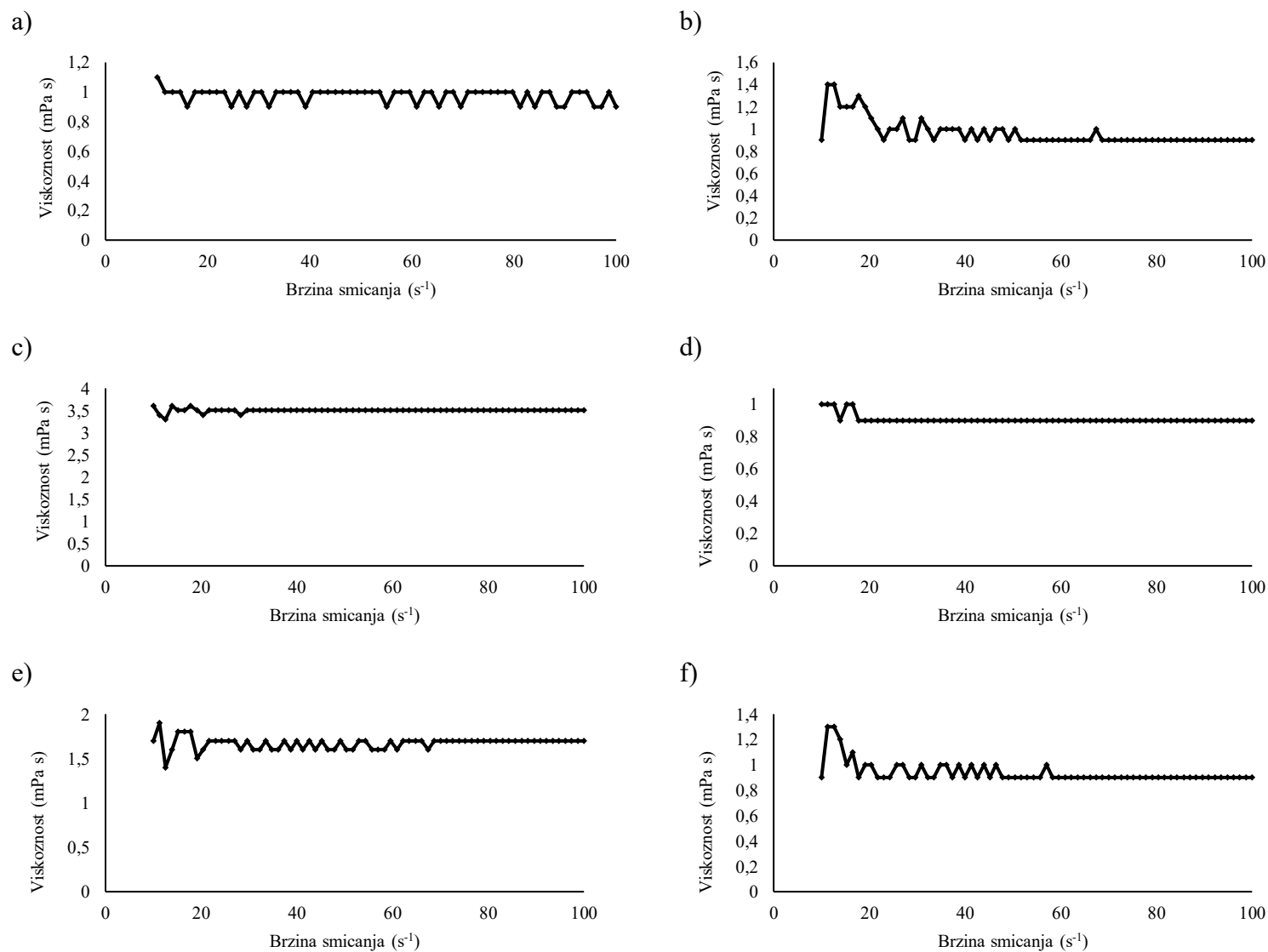
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

Slika 61. Viskoznost otopina nosača u ekstraktu dobričice za sušenje raspršivanjem



Slika 62. Krivulje tečenja za DHGG (a), DHGG_HK (b), DHGG_KMC (c), DHGG_NUT (d), DHGG_MUC (e) i DHGG_KSI (f)





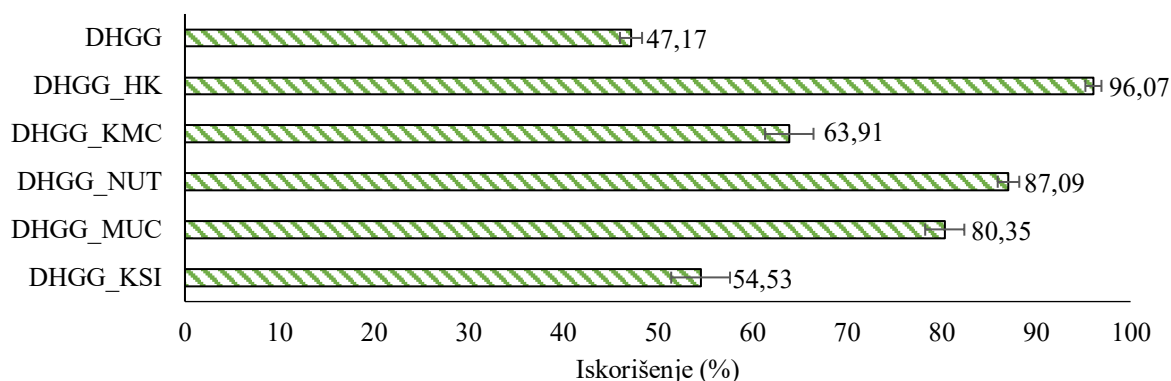
Slika 63. Krivulje viskoznosti za DHGG (a), DHGG_HK (b), DHGG_KMC (c), DHGG_NUT (d), DHGG_MUC (e) i DHGG_KSI (f)



Viskoznost otopine djelomično hidrolizirane guar gume (DHGG) iznosila je 0,922 mPa s, a jedino je dodatak mucina i karboksimetil celuloze u otopinu nosača uzrokovao statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje viskoznosti, točnije na 1,642 mPa s (DHGG_MUC) i 3,508 mPa (DHGG_KMC). Iz krivulja tečenja i krivulja viskoznosti vidljivo je da su sve otopine idealne tekućine što je poželjno za sušenje raspršivanjem jer je tekućine lakše raspršiti nego gelove i manje su sklone začepljenju mlaznice raspršivača.

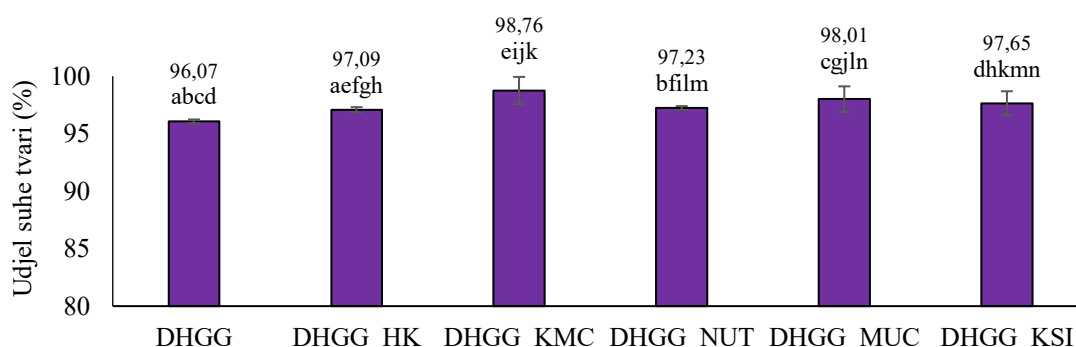
4.7.3. Određivanje prinosa i fizikalnih parametara inkapsulata

Prinos sušenja raspršivanjem prikazan je na Slici 64, dok su parametri fizikalne karakterizacije inkapsulata (udjel suhe tvari, močivost, kontaktni kut vode, nasipna gustoća, Carrov indeks, Hausnerov omjer, zeta potencijal i prosječan promjer) prikazani na Slici 65 i u Tablici 36, dok je SEM mikrografija uzoraka prikazana na Slici 66.



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

Slika 64. Prinos (%) ispitivanih inkapsulata sušenih raspršivanjem



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

Slika 65. Udjel suhe tvari (%) inkapsulata sušenih raspršivanjem



Tablica 36. Fizikalna karakterizacija inkapsulata sušenih raspršivanjem

	DHGG	DHGG_HK	DHGG_KMC	DHGG_NUT	DHGG_MUC	DHGG_KSI
Močivost (s)	43,0±1,0 ^a	218,5±3,5	2553,5±12,5	127,5±7,5	650,5±9,5	62,0±9,0 ^a
Kontaktni kut vode (°)	37±2	58±1	87±1	53±1	62±2	43±0
Nasipna gustoća (g mL ⁻¹)	1,50±0,01 ^{abcd}	0,77±0,04	1,50±0,02 ^{ae fg}	1,47±0,02 ^{be hi}	1,50±0,01 ^{cf hj}	1,50±0,03 ^{d gi j}
Carrov indeks (%)	79,6±0,4	20,3±0,3	21,5±0,2 ^{ab}	21,2±0,2 ^{ac}	23,09±0,9	21,4±0,2 ^{bc}
Hausnerov omjer	4,91±0,09	1,25±0,00 ^{abcd}	1,27±0,02 ^{ae fg}	1,27±0,02 ^{be hi}	1,30±0,02 ^{cf hj}	1,27±0,02 ^{d gi j}
Zeta potencijal (mV)	-15,76±1,62 ^a	-10,18±3,40 ^{abcd}	-22,03±0,12	-5,32±1,38 ^{be f}	-8,81±0,51 ^{ce g}	-9,33±3,19 ^{d fg}
Prosječan promjer (µm)	9,49±3,00 ^{abcde}	7,73±2,11 ^{af ghi}	9,72±4,26 ^{bf jkl}	7,91±2,21 ^{cg imn}	8,59±2,62 ^{dh km o}	10,05±2,96 ^{ei lno}

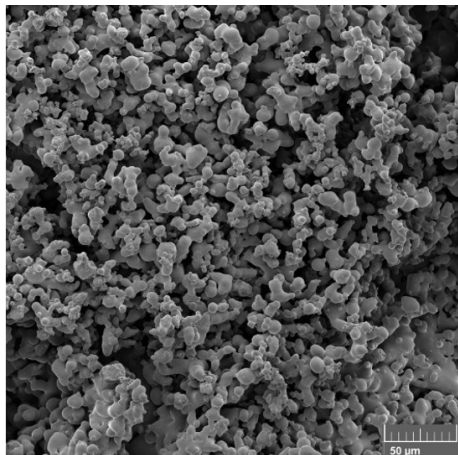
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom u istome retku nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

Po završetku sušenja raspršivanjem, najmanji prinos (47,17 %) određen je za uzorak u kojem je samo djelomično hidrolizirana guar guma bila nosač (DHGG). Dodatak svih istraživanih polimera (hidrolizat kolagena, karboksimetil celuloza, nutrioza, mucin i ksilan) rezultirao je statistički značajnim ($p < 0,05$) povećanjem prinosa. Najveći prinos (96,07 %) postignut je u kombinaciji s hidrolizatom kolagena (DHGG_HK). Suha tvar dobivenih inkapsulata bila je u rasponu od 96,07 % (DHGG) do 98,76 % (DHGG_KMC).

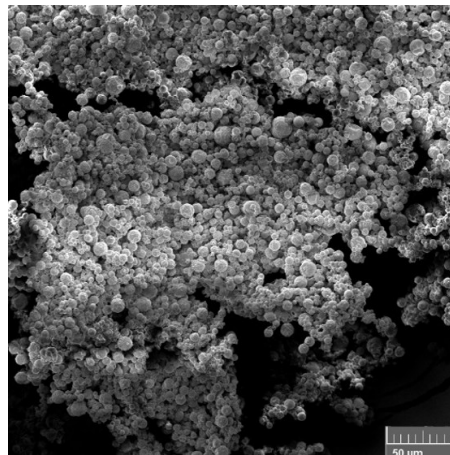
Dodatak svih polimera, izuzev ksilana, u sustave s djelomično hidroliziranom guar gumom statistički je značajno ($p < 0,05$) smanjio močivost inkapsulata pa je tako najkraće vrijeme močivosti od 43,0 s određeno za uzorak DHGG, a dodatkom karboksimetil celuloze to vrijeme produženo je čak na 2553,5 s (DHGG_KMC). Najniža vrijednost kontaktnog kuta vode zabilježena je u uzorku DHGG (37 °), dok je dodatak svih ispitivanih polimera statistički značajno ($p < 0,05$) povećao te vrijednosti pa je najveća vrijednost od 87 ° opet izmjerena u uzorku s dodatkom karboksimetil celuloze (DHGG_KMC).



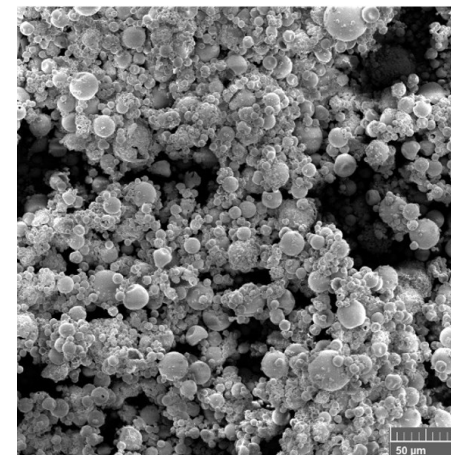
a)



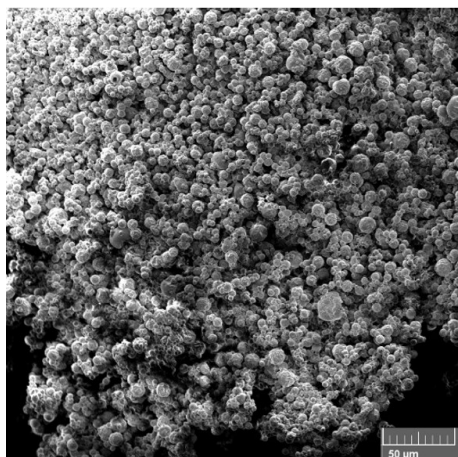
b)



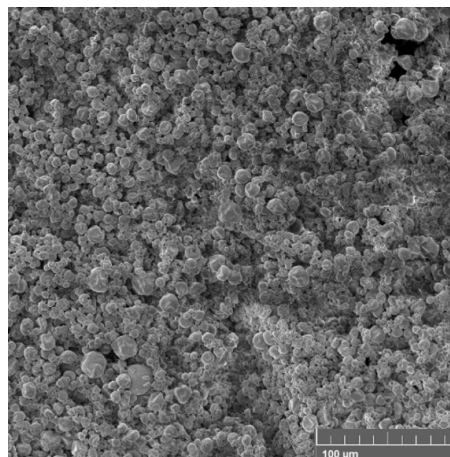
c)



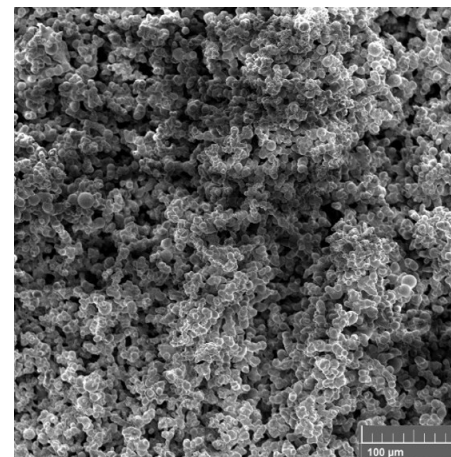
d)



e)



f)



Slika 66. SEM mikrografija (600 x): DHGG (a), DHGG_HK (b), DHGG_KMC (c), DHGG_NUT (d), DHGG_MUC (e) i DHGG_KSI (f)



Što se tiče nasipne gustoće, samo je dodatak hidrolizata kolagena u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG_HK) uzrokovao statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$), dok dodatak ostalih polimera nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecao na nasipnu gustoću. Svojstva tecivosti inkapsulata izražena su Carrovim indeksom (CI), a svojstva kohezivnosti Hausnerovim omjerom (HR). Dodatak svih polimera u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom statistički je značajno ($p < 0,05$) poboljšao svojstva tecivosti dobivenih inkapsulata što je dokazano smanjenjem CI vrijednosti uzorka DHGG sa 79,6 %, (vrlo loša svojstva tecivosti, $CI > 45$ %), na CI vrijednosti koje inkapsulate stavljaju u raspon dobrih svojstava tecivosti ($CI = 20 - 45$ %). Slični rezultati dobiveni su za kohezivnost inkapsulata gdje se HR smanjio s 4,91, za uzorak DHGG, na vrijednosti ispod 1,4 što ukazuje na srednju kohezivnost.

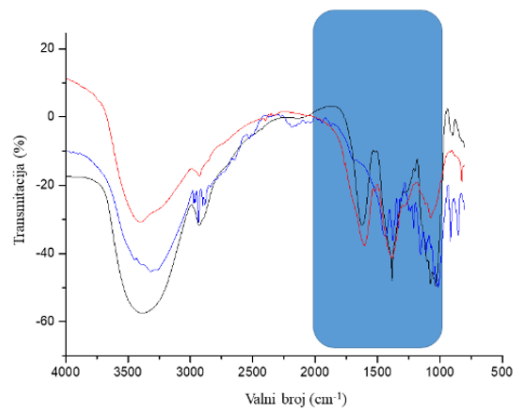
Vrijednosti zeta potencijala bile su u rasponu od -21,03 mV, izmjerene za uzorak DHGG_KMC koji prema tome ima najmanju tendenciju agregacije, do -5,32 mV, izmjerene za uzorak DHGG_NUT koji je, prema tome, pokazao i najveću mogućnost agregacije.

Prosječan promjer i morfologija inkapsulata ispitani su pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Prosječne vrijednosti promjera inkapsulata bile su u rasponu od 7,73 μm (DHGG_HK) do 10,05 μm (DHGG_KSI), ali nije uočena statistička značajna ($p > 0,05$) razlika među uzorcima. SEM analiza pokazala je heterogenu raspodjelu veličine čestica u svim uzorcima – uočene su male čestice veličine oko 3 μm do većih čestica čak do oko 20 μm . Heterogena raspodjela veličine čestica bila je najizraženija u uzorku DHGG_KMC.

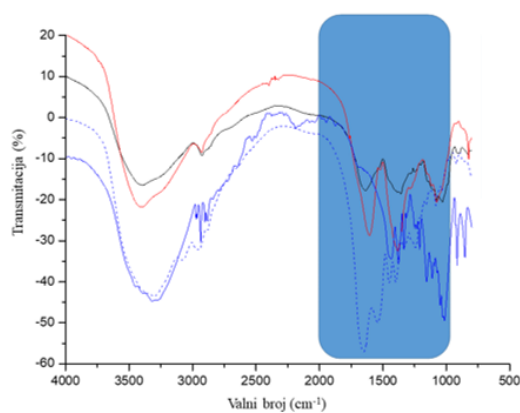
4.7.4. Određivanje funkcionalnih veza FT-IR spektroskopijom

IR spektri ekstrakta dobričice, polimernih nosača (djelomično hidrolizirana guar guma, hidrolizat kolagena, karboksimetil celuloza, nutrioza, mucin i ksilan) i inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem prikazani su na Slikama 67 – 69.

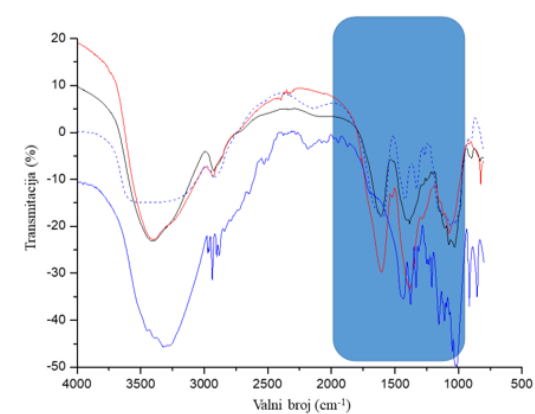




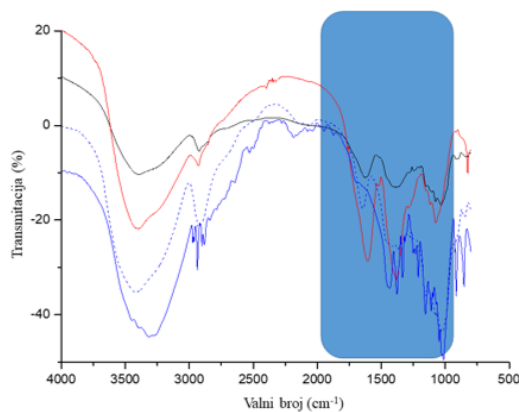
a) IR spektar ekstrakta dobričice (—); djelomično hidrolizirane guar gume (DHGG) (—); inkapsulata pripremljenog s DHGG (—)



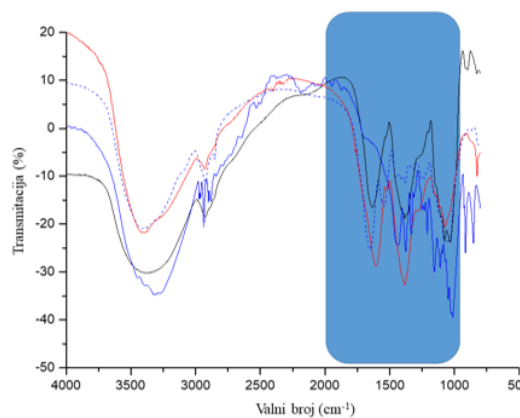
b) IR spektar ekstrakta dobričice (—); djelomično hidrolizirane guar gume (DHGG) (—); hidrolizata kolagena (- - -); inkapsulata pripremljenog s DHGG i hidrolizatom kolagena (—)



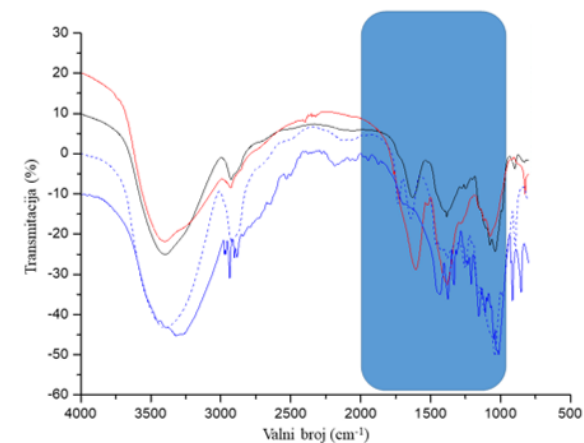
c) IR spektar ekstrakta dobričice (—); djelomično hidrolizirane guar gume (DHGG) (—); karboksimetil celuloze (- - -); inkapsulata pripremljenog s DHGG i karboksimetil celulozom (—)



d) IR spektar ekstrakta dobričice (—); djelomično hidrolizirane guar gume (DHGG) (—); nutrizoe (- - -); inkapsulata pripremljenog s DHGG i nutrizoom (—)



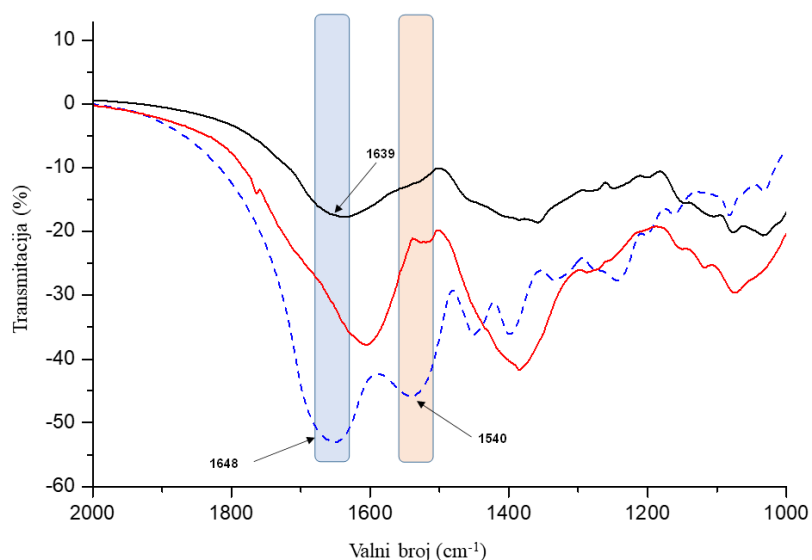
e) IR spektar ekstrakta dobričice (—); djelomično hidrolizirane guar gume (DHGG) (—); mucina (- - -); inkapsulata pripremljenog s DHGG i mucinom (—)



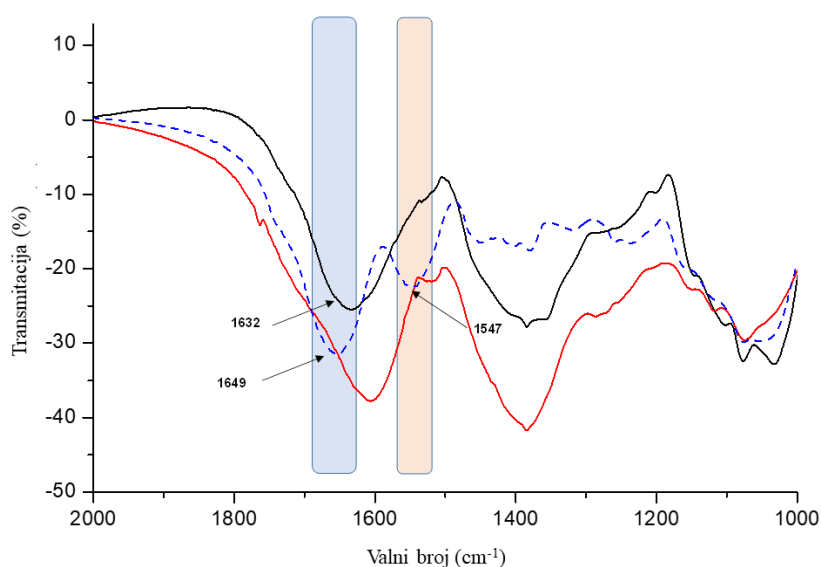
f) IR spektar ekstrakta dobričice (—); djelomično hidrolizirane guar gume (DHGG) (—); ksilana (- - -); inkapsulata pripremljenog s DHGG i ksilanom (—)

Slika 67. IR spektri ekstrakta dobričice, polimernih nosača i inkapsulata (područje od 2000 do 1000 cm^{-1} je obojeno plavo)





Slika 68. IR spektar ekstrakta dobričice (—); hidrolizata kolagena (- - -); inkapsulata pripremljenog s DHGG i hidrolizatom kolagena (—) s naglašenim pomacima vibracija istezanja karbonilnih skupina



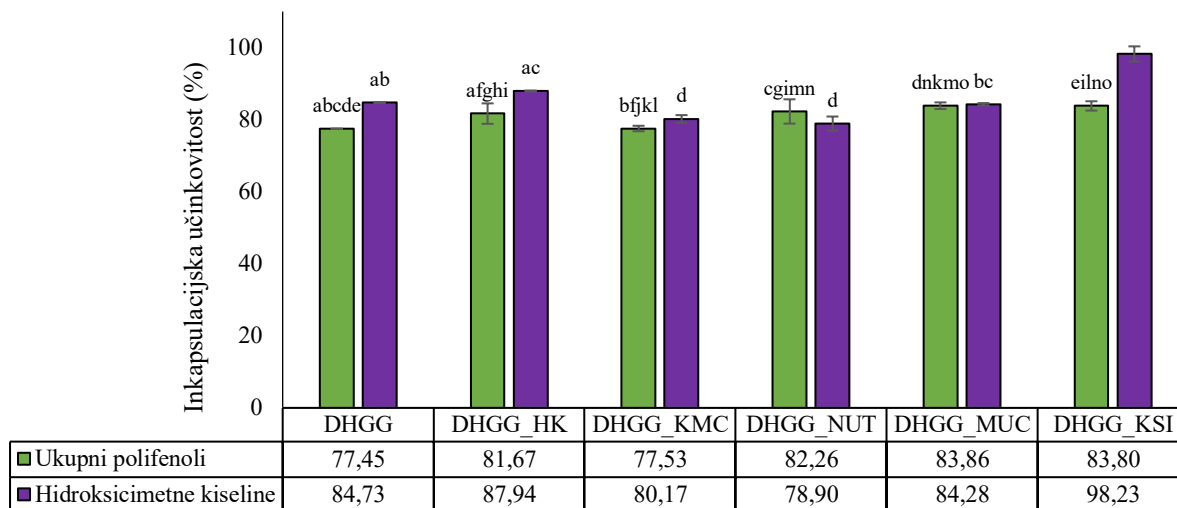
Slika 69. IR spektar ekstrakta dobričice (—); mucina (- - -); inkapsulata pripremljenog s DHGG i mucinom (—) s naglašenim pomacima vibracija istezanja karbonilnih skupina

4.7.5. Određivanje bioaktivnih svojstava inkapsulata

Bioaktivna karakterizacija inkapsulata uključivala je određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenolnih spojeva, hidroksicimetnih kiselina i pojedinačnih polifenolnih spojeva. Rezultati su prikazani na Slici 70 i u Tablici 37. Simulirana probava inkapsulata u želucu i



tankom crijevu praćena je određivanjem udjela ukupnih polifenolnih spojeva i hidrokscimetnih kiselina otpuštenih u određenom vremenskom periodu, a rezultati su prikazani na Slikama 71 i 72.



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

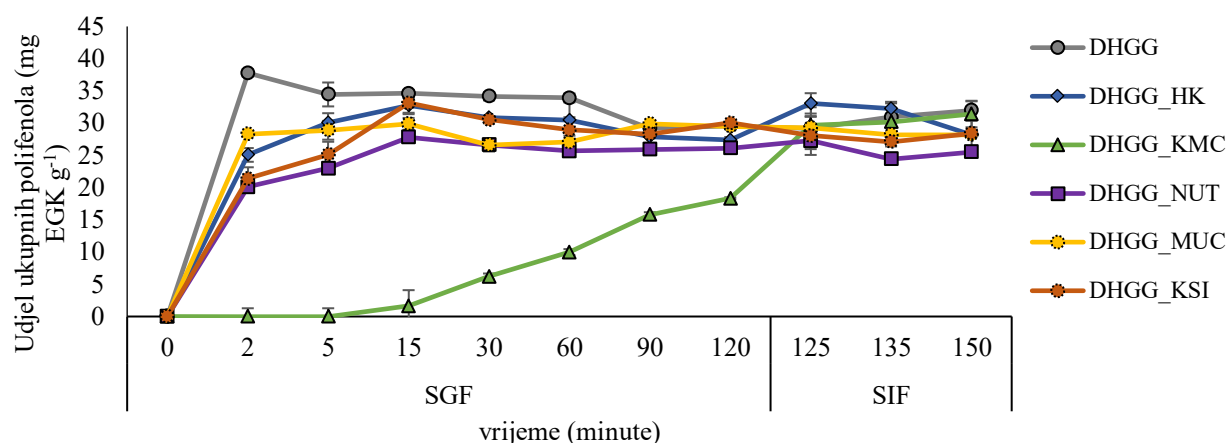
Slika 70. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenolnih spojeva i hidrokscimetnih kiselina ekstrakta dobričice sušenog raspršivanjem

Tablica 37. Učinkovitost inkapsulacije (%) pojedinačnih polifenolnih spojeva ekstrakta dobričice sušenog raspršivanjem

Uzorak	Klorogenska kiselina	Kriptoklorogenska kiselina	Kafeinska kiselina	Ružmarinska kiselina	Rutin
DHGG	91,95±0,19 ^a	94,15±2,45 ^{abcd}	85,23±0,81 ^{ab}	86,22±2,15 ^a	96,50±0,99 ^a
DHGG_HK	85,89±0,13	85,60±1,12	85,02±1,03 ^{ac}	79,12±0,17 ^b	85,88±0,53
DHGG_KMC	88,52±1,01 ^b	95,16±0,76 ^{afg}	85,43±0,08 ^{bc}	76,96±0,97 ^c	48,50±0,13
DHGG_NUT	94,51±0,97	97,34±0,71 ^{beh}	91,27±2,11 ^{de}	87,95±0,73 ^a	93,05±0,87 ^{bc}
DHGG_MUC	89,82±0,14 ^{bc}	92,11±0,83 ^{cf}	91,14±0,94 ^{df}	94,64±1,23	93,24±0,11 ^{bd}
DHGG_KSI	90,69±0,68 ^{ac}	97,40±0,07 ^{dgh}	89,41±1,43 ^{ef}	80,11±0,77 ^{bc}	94,07±1,67 ^{acd}

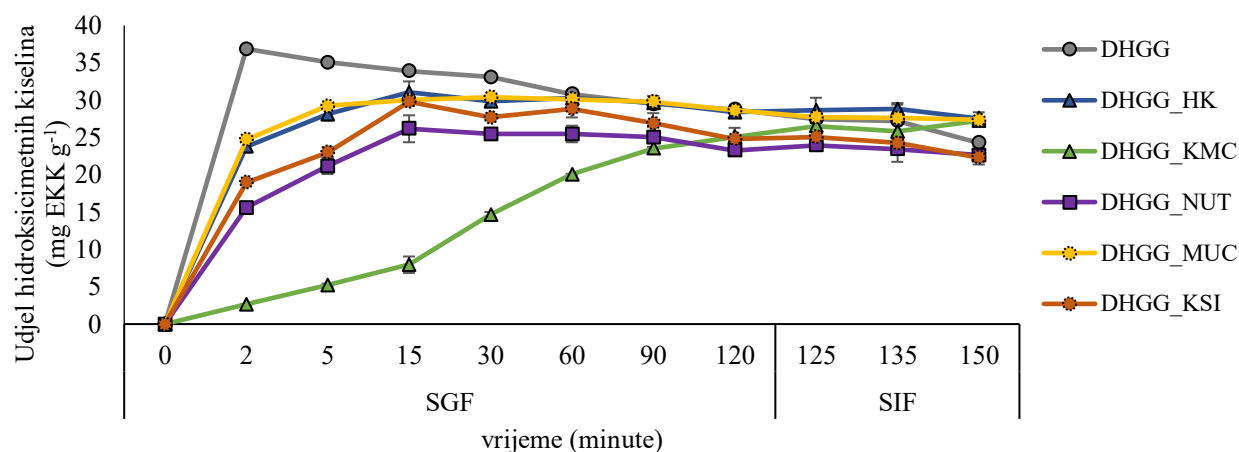
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom u istome stupcu nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.





EGK-ekvivalenti galne kiseline

Slika 71. Kinetika otpuštanja u želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF) praćena otpuštanjem ukupnih polifenola



EKK-ekvivalenti kafeinske kiseline

Slika 72. Kinetika otpuštanja u želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF) praćena otpuštanjem ukupnih hidrokisicimernih kiselina

Sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG) rezultirao je učinkovitošću inkapsulacije ukupnih polifenola od 77,45 %, što nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$) promijenjeno dodatkom ispitivanih polimera u sustav, dok je određivanjem udjela hidrokisicimernih kiselina, dodatak ksilana (DHGG_KSI) rezultirao statistički značajnim povećanjem ($p < 0,05$) njihovog zadržavanja, pri čemu je učinkovitost inkapsulacije iznosila čak



98,23 %. Statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) zadržavanja hidrokscimetnih kiselina uočeno je dodatkom karboksimetil celuloze (DHGG_KMC; 80,17 %) i nutrioze (DHGG_NUT; 78,90 %), ali unatoč tome, vrijednosti inkapsulacijskih učinkovitosti i dalje su bile visoke. Najviša učinkovitost inkapsulacije za klorogensku kiselinu (94,51 %) određena je u uzorku DHGG_NUT, u kojem je detektirana i najviša vrijednost za kriptoklorogensku kiselinu (97,34 %). Visoke vrijednosti učinkovitosti inkapsulacije za kriptoklorogensku kiselinu određene su i u uzorcima DHGG (94,15 %), DHGG_KMC (95,16 %) i DHGG_KSI (97,40 %). Kafeinska kiselina pokazala je najviše zadržavanje u uzorcima DHGG_NUT (91,27 %), DHGG_MUC (91,14 %) i DHGG_KSI (89,41 %), a rutin u uzorcima DHGG (96,50 %) i DHGG_KSI (94,07 %). Najviša vrijednost učinkovitosti inkapsulacije za ružmarinsku kiselinu, koja je najzastupljeniji polifenolni spoj dobričice, određena je u uzorku DHGG_MUC s vrijednošću od 94,64 %.

Praćenjem kinetike otpuštanja polifenolnih spojeva i hidrokscimetnih kiselina inkapsulata dobričice u uvjetima simulirane probave, ispitivani bioaktivni spojevi već su se unutar prve 2 minute u SGF-u otpustili iz uzorka DHGG. Dodatak hidrolizata kolagena (DHGG_HK), nutrioze (DHGG_NUT), mucina (DHGG_MUC) i ksilana (DHGG_KSI) omogućio je produljeno otpuštanje spojeva iz inkapsulacijskih sustava do 15 minuta u SGF-u, nakon čega je primijećeno relativno konstantno otpuštanje s manjim fluktuacijama. Najpoželjnija kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva i hidrokscimetnih kiselina u pogledu njihovog kontroliranog i kontinuiranog otpuštanja postignuta je binarnim sustavom djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze (DHGG_KMC).

4.8. Liposomalna inkapsulacija

4.8.1. Određivanje fizikalnih i morfoloških svojstava inkapsulata

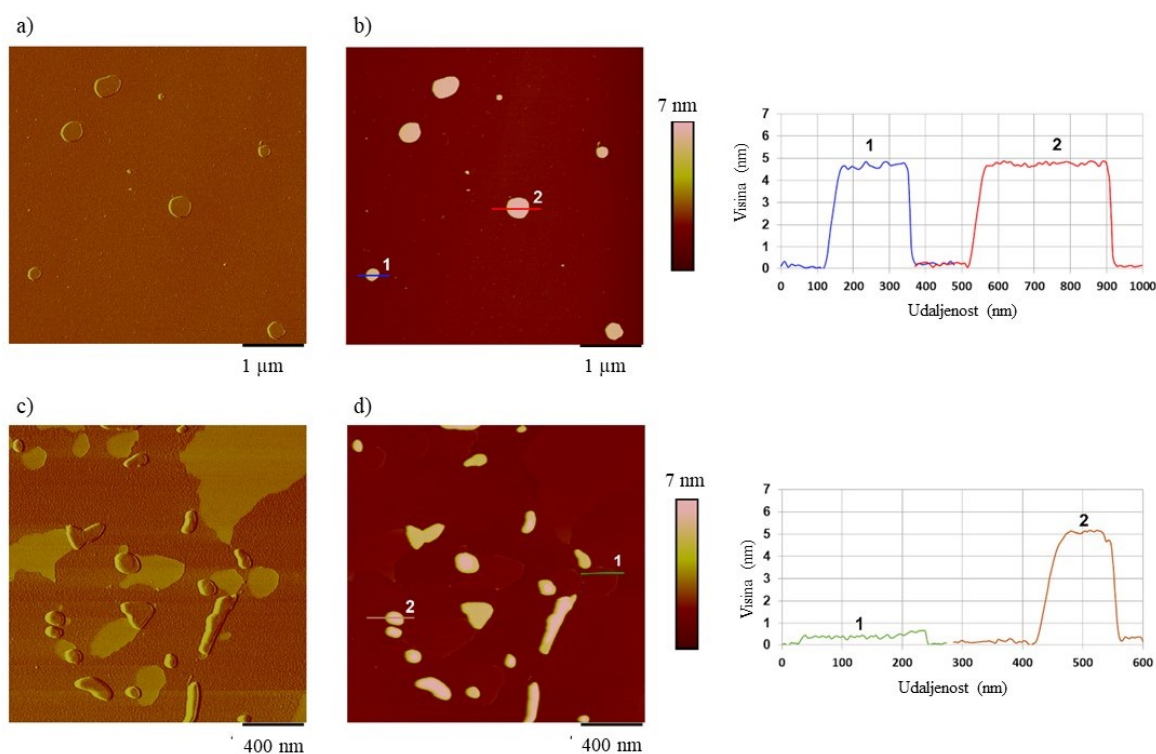
Fizikalna karakterizacija praznih liposoma i liposomalnih inkapsulata ekstrakta dobričice uključivala je određivanje njihove veličine, indeksa polidisperzije i zeta potencijala te su rezultati prikazani u Tablici 38. Rezultati morfološke karakterizacije (AFM analize) prikazani su na Slici 73.



Tablica 38. Fizikalna karakterizacija liposoma

Uzorak	Prosječan promjer (nm)	Indeks polidisperzije	Zeta potencijal (mV)
Prazni liposomi	192,9 ± 4,6	0,33 ± 0,01	-27,98 ± 0,98
Liposomalni inkapsulati	106,7 ± 0,9	0,21 ± 0,01	-21,17 ± 0,46

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom u istome stupcu nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Studentov t-test.



Slika 73. AFM slike praznih liposoma na površini tinjca – slika faze (a) i topografska slika (b) i liposomalnih inkapsulata na površini tinjca - slika faze (c) i topografska slika (d) s pripadajućim vertikalnim presjecima

Iz prikazanih rezultata, vidljivo je da je dodatak ekstrakta dobričice u liposome uzrokovao statistički značajne promjene ($p < 0,05$) ispitivanih fizikalnih parametara. Prosječan promjer praznih liposoma iznosio je 192,9 nm, dok je kod liposomalnih inkapsulata uočen manji prosječan promjer od 106,7 nm. Prema AFM analizi, prazni liposomi formirali su lipidni dvosloj visine oko 5 nm i širine u rasponu od 70 do 450 nm. Iste vrijednosti visine određene su i za liposomalne inkapsulate te širina u rasponu od 60 do 460 nm. Prazni liposomi pokazali su sferičan oblik, dok su kod liposomalnih inkapsulata primijećeni i nepravilni oblici. Također, na

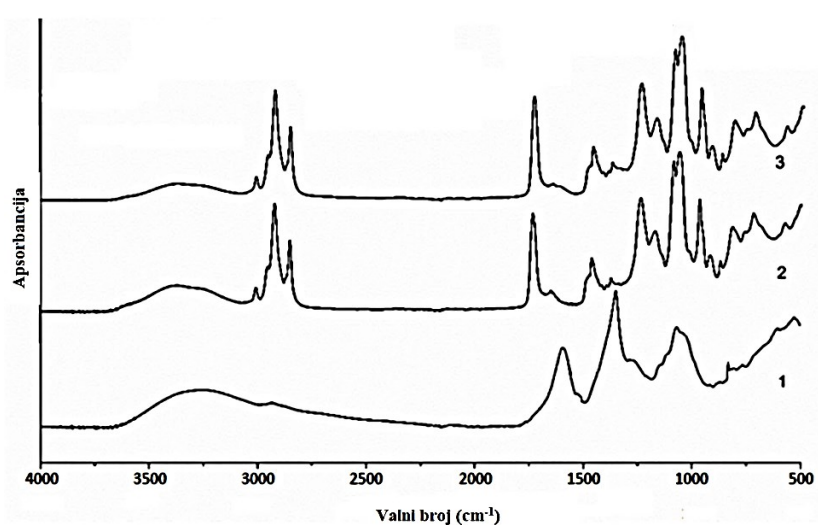


topografskoj slici liposomalnih inkapsulata uočene su ravne strukture visine 0,5 nm što je najvjerojatnije posljedica otpuštanja inkapsuliranog ekstrakta iz liposoma tijekom analize.

Liposomalni inkapsulati pokazali su homogeniju raspodjelu veličine s indeksom polidisperzije u vrijednosti od 0,21, u usporedbi s praznim liposomima kod kojih je isti iznosio 0,33. Zeta potencijal praznih liposoma iznosio je -27,98 mV, a liposomalnih inkapsulata -21,17 mV.

4.8.2. Određivanje funkcionalnih veza FT-IR spektroskopijom

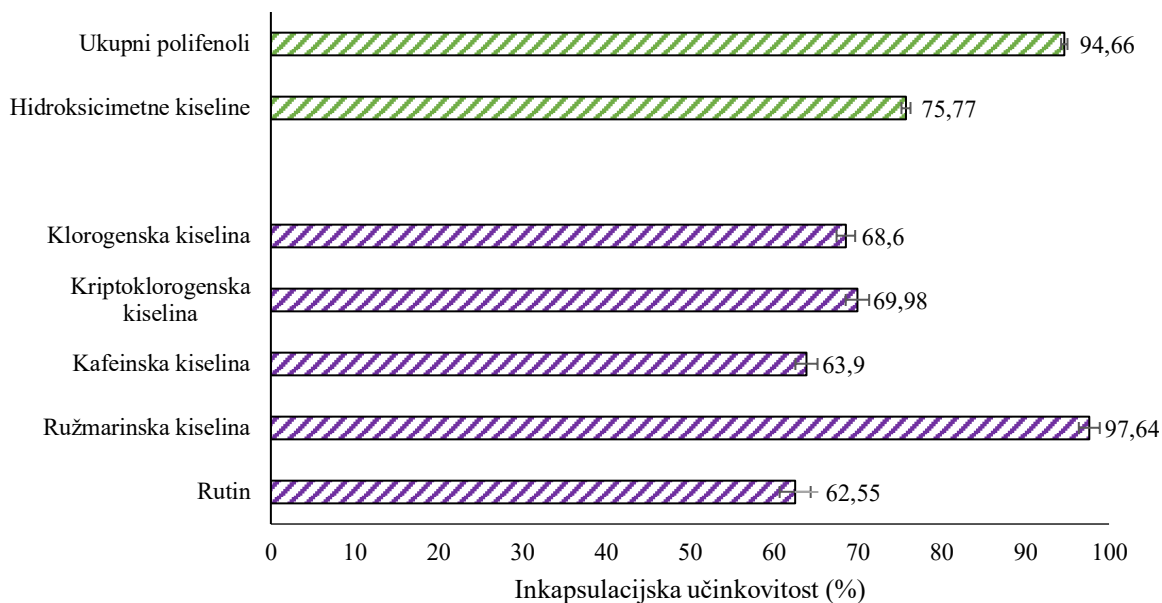
IR spektri ekstrakta dobričice, praznih liposoma i liposomalnih inkapsulata prikazani su na Slici 74.



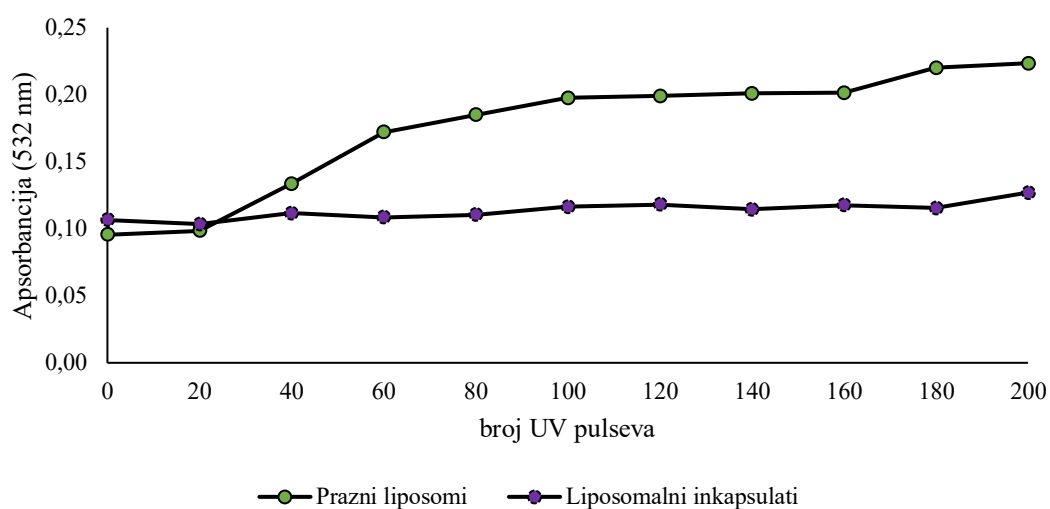
Slika 74. IR spektri ekstrakta dobričice (1) praznih liposoma (2) i liposomalnih inkapsulata (3)

4.8.3. Određivanje bioaktivnih svojstava inkapsulata

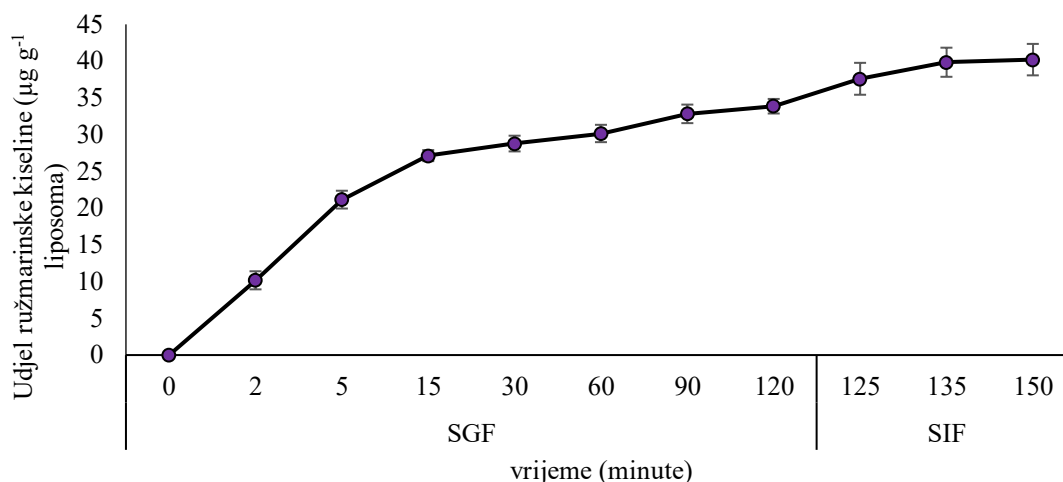
Bioaktivna karakterizacija liposomalnih inkapsulata uključivala je određivanje udjela ukupnih polifenolnih spojeva, hidroksicimetnih kiselina i pojedinačnih polifenolnih spojeva (Slika 75). Rezultati antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta dobričice u inkapsuliranom obliku određenog TBARS metodom prikazani na Slici 76. Promjene u uvjetima simulirane probave u želucu i tankom crijevu praćene su određivanjem udjela ružmarinske kiseline, kao najzastupljenijeg polifenolnog spoja, otpuštenog u određenom vremenskom periodu. Rezultati su prikazani na Slici 77.



Slika 75. Učinkovitost liposomalne inkapsulacije (%) definirane udjelom ukupnih polifenolnih spojeva, hidroksicimetnih kiselina i pojedinačnih polifenolnih spojeva



Slika 76. Utjecaj inkapsuliranog ekstrakta dobričice na intenzitet UV-inducirane lipidne peroksidacije, određen TBARS metodom



Slika 77. Kinetika otpuštanja ružmarinske kiseline iz liposomalnih inkapsulata u uvjetima simulirane probave u želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF)

Uočena je izrazito visoka inkapsulacijska učinkovitost za ukupne polifenole (94,66 %), kao i za najzastupljeniji polifenolni spoj dobričice – ružmarinsku kiselinu (97,64 %). Za klorogensku, kriptoklorogensku, kafeinsku kiselinu i rutin, vrijednosti su bile u rasponu od oko 60 do 70 %, što je također visoka inkapsulacijska učinkovitost. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih hidroksicimetnih kiselina iznosila je 75,77 %.

Antioksidacijski kapacitet inkapsuliranog ekstrakta dobričice u inhibiciji peroksidacije lipida izazvane UV zračenjem određen je TBARS metodom. Prema dobivenim rezultatima, ekstrakt dobričice zadržao je svoj antioksidacijski kapacitet u liposomalnom sustavu, budući da je stvaranje malondialdehida bilo znatno manje u liposomima s inkapsuliranim ekstraktom u usporedbi s praznim liposomima. Nakon UV zračenja od 200 pulseva, stvaranje malondialdehida bilo je 1,76 puta manje nego u praznim liposomima.

Praćenjem simulirane probave liposomalnog inkapsulata uočeno je kontinuirano i kontrolirano otpuštanje ružmarinske kiseline tijekom 120 minuta u SGF-u i 30 minuta u SIF-u.

4.9. Karakterizacija bioloških učinaka liposomalnog ekstrakta dobričice *in vivo*

4.9.1. Određivanje udjela proteina u homogenatima organa

Udjeli proteina u homogenatima organa štakora prikazani su u Tablici 39.

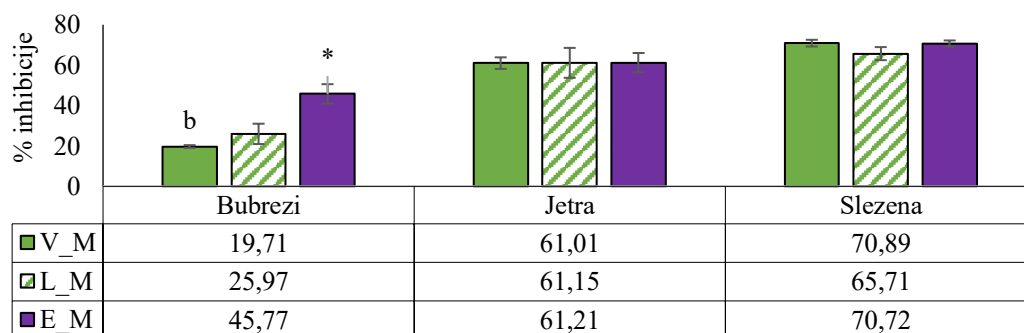
Tablica 39. Udjel (mg mL^{-1}) proteina u homogenatima bubrega, slezene i jetre

<i>Muški štakori</i>			
Skupina	Bubrezi	Slezena	Jetra
V_M	7,65 ± 0,78	16,94 ± 2,10	16,77 ± 1,76
L_M	9,31 ± 0,80	15,12 ± 1,70	17,30 ± 1,78
E_M	10,76 ± 1,64	18,65 ± 3,03	23,00 ± 6,65
<i>Ženski štakori</i>			
Skupina	Bubrezi	Slezena	Jetra
V_Ž	7,60 ± 0,42	15,33 ± 1,29	14,61 ± 1,63
L_Ž	6,91 ± 2,15	16,09 ± 1,62	16,19 ± 1,52
E_Ž	10,60 ± 1,29	20,84 ± 3,98	21,54 ± 2,29

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije.

4.9.2. Određivanje parametara oksidacijskog stresa u organima

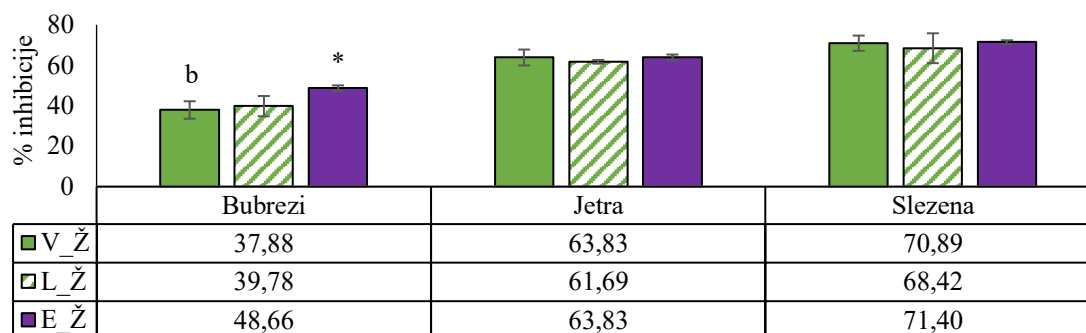
Parametri oksidacijskog stresa u bubrezima, slezeni i jetri, uključujući antioksidacijski kapacitet, intenzitet karbonilacije proteina i lipidne peroksidacije te aktivnost superoksid dismutaze i koncentraciju ukupnog glutationa, prikazani su na Slikama 78 – 87.



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_M ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_M ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_M ($p < 0,05$).

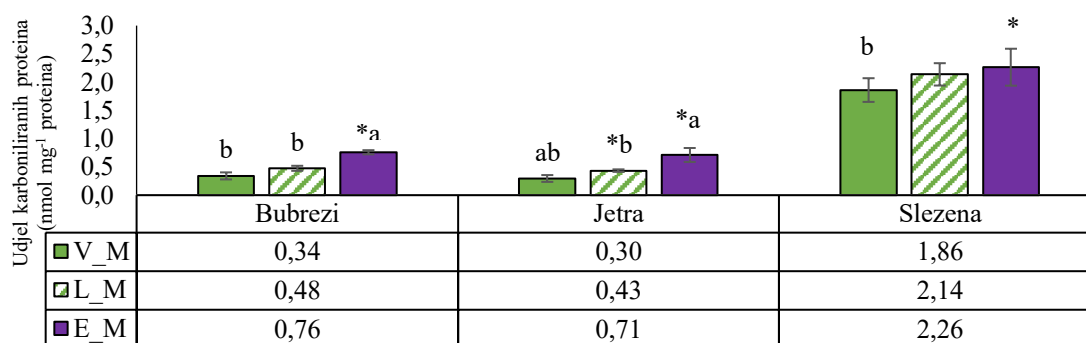
Slika 78. Antioksidacijski kapacitet organa muških štakora





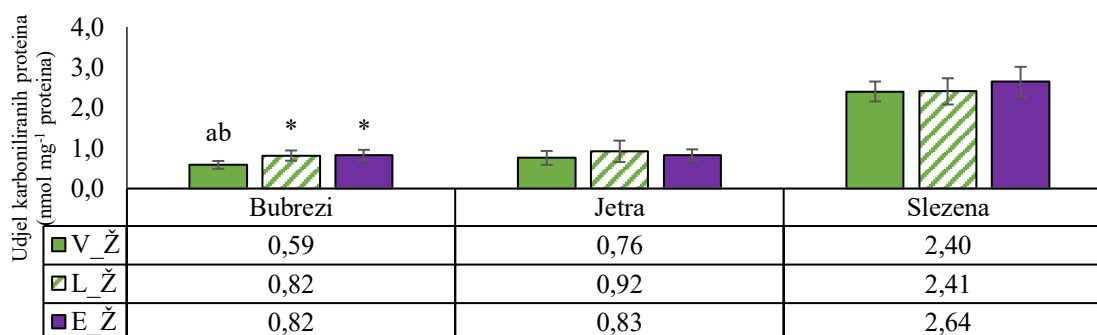
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_Ž ($p < 0,05$).

Slika 79. Antioksidacijski kapacitet organa ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_M ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_M ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_M ($p < 0,05$).

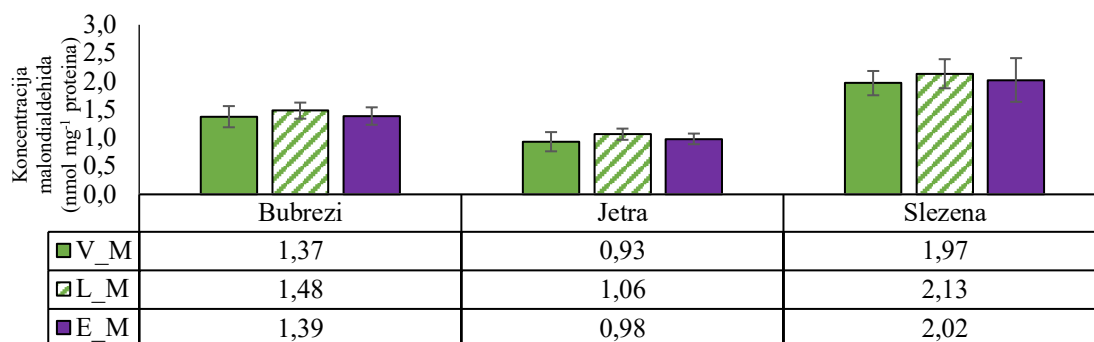
Slika 80. Udjel karboniliranih proteina u organima muških štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_Ž ($p < 0,05$).

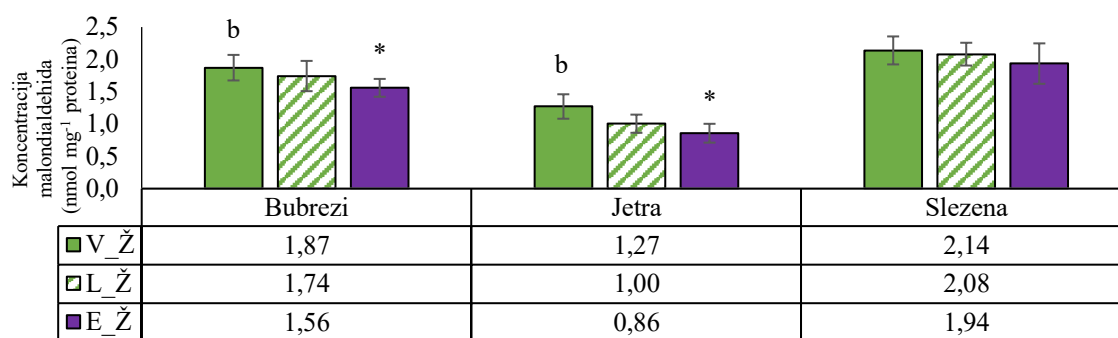
Slika 81. Udjel karboniliranih proteina u organima ženskih štakora





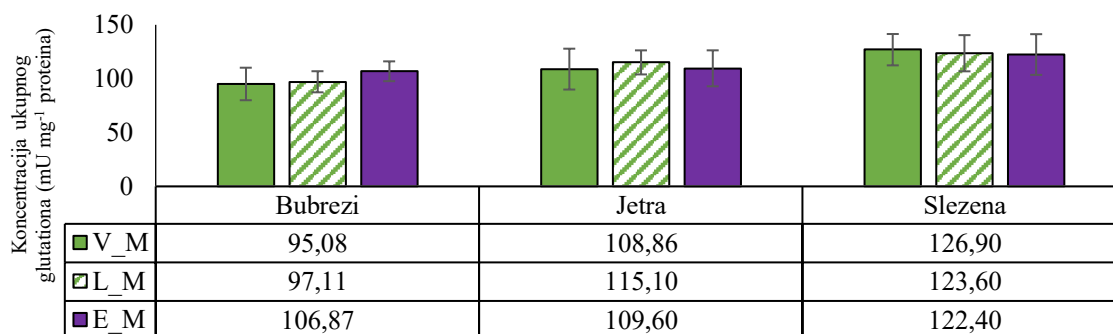
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_M ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_M ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_M ($p < 0,05$).

Slika 82. Intenzitet lipidne peroksidacije u organima muških štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_Ž ($p < 0,05$).

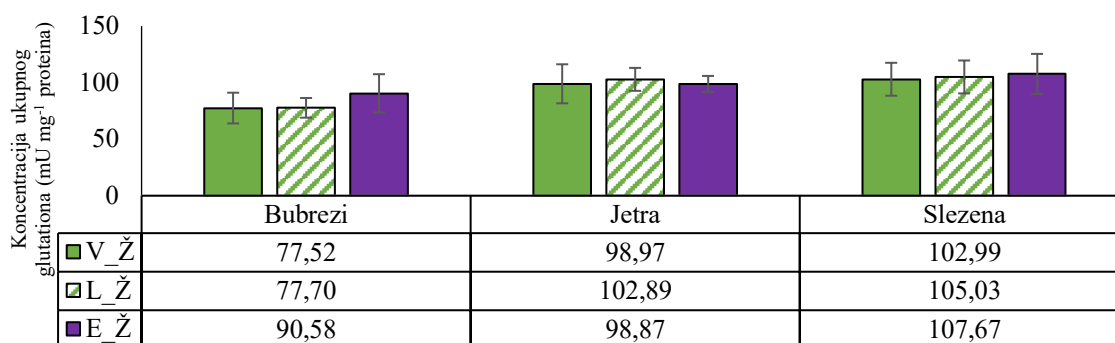
Slika 83. Intenzitet lipidne peroksidacije u organima ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_M ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_M ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_M ($p < 0,05$).

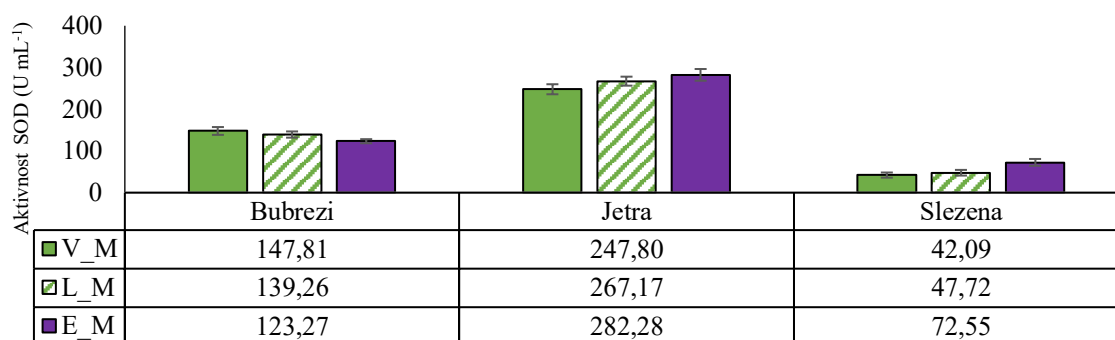
Slika 84. Koncentracija ukupnog glutaciona u organima muških štakora





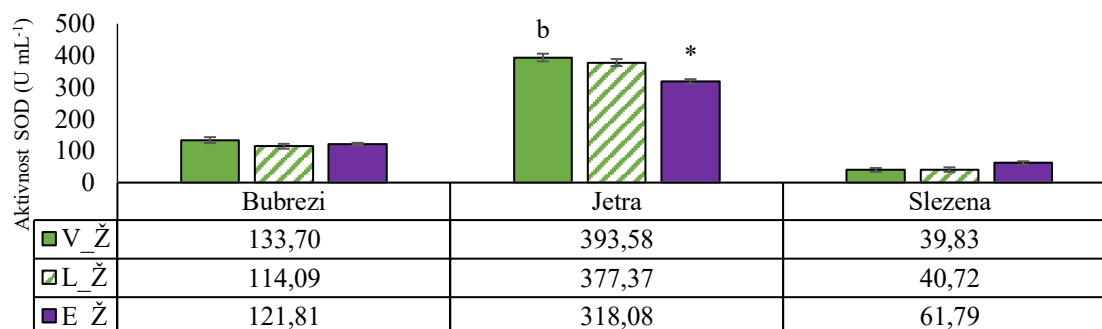
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_Ž ($p < 0,05$).

Slika 85. Koncentracija ukupnog glutaciona u organima ženskih štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_M ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_M ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_M ($p < 0,05$).

Slika 86. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u organima muških štakora



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći Kruskal-Wallis test. *-statistički značajna razlika u odnosu na V_Ž ($p < 0,05$); a-statistički značajna razlika u odnosu na L_Ž ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na E_Ž ($p < 0,05$).

Slika 87. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u organima ženskih štakora



Tretman liposomalnim inkapsulatom ekstrakta dobričice rezultirao je statistički značajnim ($p < 0,05$) povećanjem antioksidacijskog kapaciteta bubrega muških i ženskih štakora, dok je kod slezene i jetre ostao nepromijenjen ($p > 0,05$).

Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje udjela karboniliranih proteina kod muških i ženskih štakora tretiranih liposomalnim inkapsulatom uočeno je u bubrezima, dok je kod ženskih štakora statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje udjela karboniliranih proteina uzrokovao i tretman praznim liposomima. Tretman praznim liposomima i liposomalnim inkapsulatom uzrokovao je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje udjela karboniliranih proteina i u jetri muških štakora, a u slezeni samo tretman liposomalnim inkapsulatom. Kod ženskih štakora, nije uočen statistički značajan ($p > 0,05$) utjecaj ni praznih liposoma ni liposomalnog inkapsulata na udjel karboniliranih proteina u jetri i slezeni.

Kod muških štakora nije uočena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u intenzitetu lipidne peroksidacije između skupina kod svih organa, dok je kod ženskih štakora uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje intenziteta peroksidacije lipida bubrega i jetre uslijed tretmana liposomalnim inkapsulatom.

Nije uočena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između skupina muških i ženskih štakora u koncentraciji ukupnog glutaciona u bubrezima, jetri i slezeni.

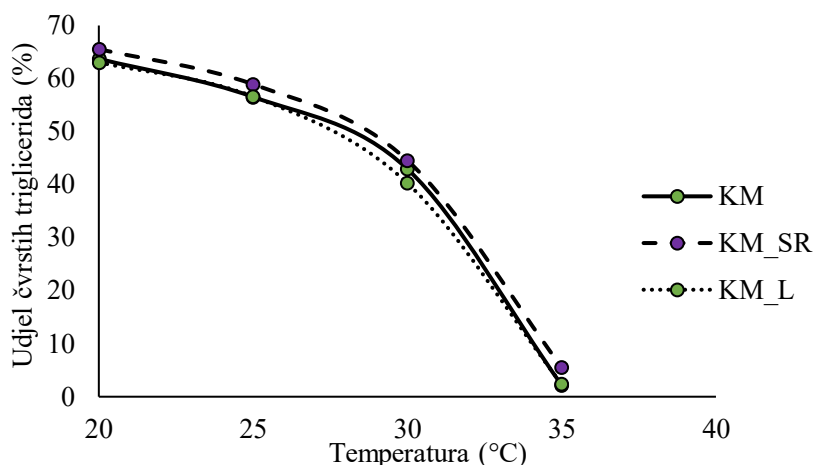
Tretman praznim liposomima i liposomalnim inkapsulatom nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecao na aktivnost superoksid dismutaze bubrega, jetre i slezene muških štakora, dok je kod ženskih štakora uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze u jetri nakon tretmana liposomalnim inkapsulatom.

4.10. Formulacija funkcionalnih čokolada

4.10.1. Određivanje udjela čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu

Udjeli čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu korištenim za izradu čokolada (KM) i kakaovom maslacu obogaćenim dodatkom inkapsulata dobričice dobivenog sušenjem raspršivanjem (KM_SR) i liposomalnim inkapsulatom dobričice (KM_L) prikazani su na Slici 88.





Slika 88. Udjeli čvrstih triglicerida u uzorcima kakaovog maslaca kod različitih temperatura

Udjel čvrstih triglicerida kakaovog maslaca pri temperaturama od 20, 25, 30 i 35 °C iznosio je redom 63,71, 56,53, 42,95 i 2,19 %. Pri temperaturi od 20 °C udjeli čvrstih triglicerida u uzorcima s dodatkom inkapsulata sušenog raspršivanjem (KM_SR) i liposomalnog inkapsulata (KM_L) bili su 65,55 % (KM_SR) i 63,05 % (KM_L). Povišenjem temperature na 25 °C udjeli čvrstih triglicerida u istim uzorcima smanjili su se na 58,90 % (KM_SR) i 56,59 % (KM_L), a daljnje povećanje temperature na 30 °C uzrokovalo je smanjenje udjela čvrstih triglicerida na 44,57 % (KM_SR) i 40,27 % (KM_L). Povišenje temperature na 35 °C rezultiralo je izrazitim smanjenjem udjela čvrstih triglicerida te je u uzorku KM_SR iznosio 5,56 %, a u uzorku KM_L 2,37 %.

4.10.2. Određivanje bioaktivnog sastava čokolada

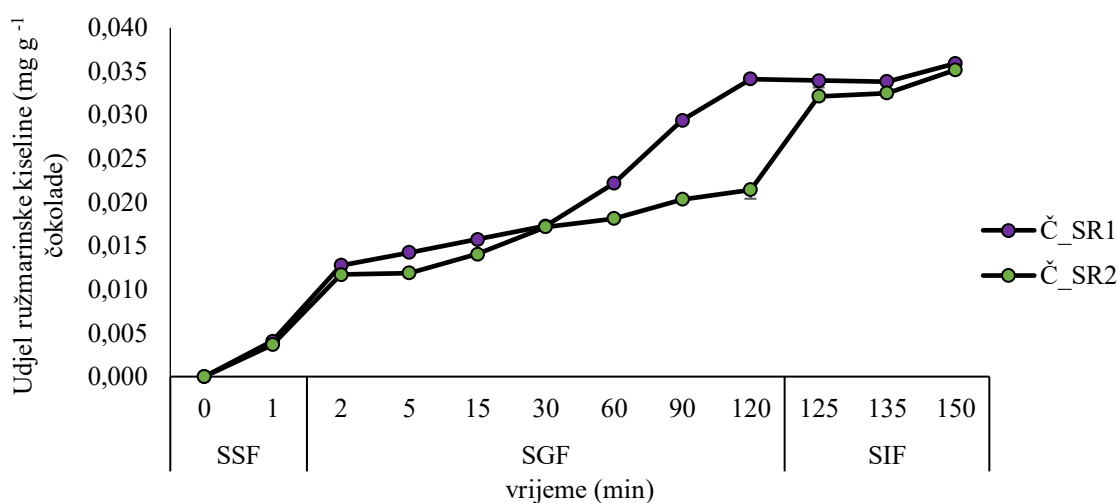
Udjeli detektiranih pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina u novoformuliranim čokoladama prikazani su u Tablici 40. Promjene tijekom simulirane probave čokolade u ustima, želucu i tankom crijevu praćene su određivanjem udjela ružmarinske kiseline otpuštene u određenom vremenskom periodu. Rezultati su prikazani na Slikama 89 i 90.

Čokolade Č_SR1 i Č_L1 pripremljene su na način da su inkapsulat dobiven sušenjem raspršivanjem i liposomalni inkapsulat dodani direktno u čokoladnu masu, dok su se kod pripreme uzoraka čokolada Č_SR2 i Č_L2 inkapsulati prethodno homogenizirali u kakaovom maslacu te je potom takav obogaćeni kakaov maslac dodan u čokoladnu masu (Slika 26).

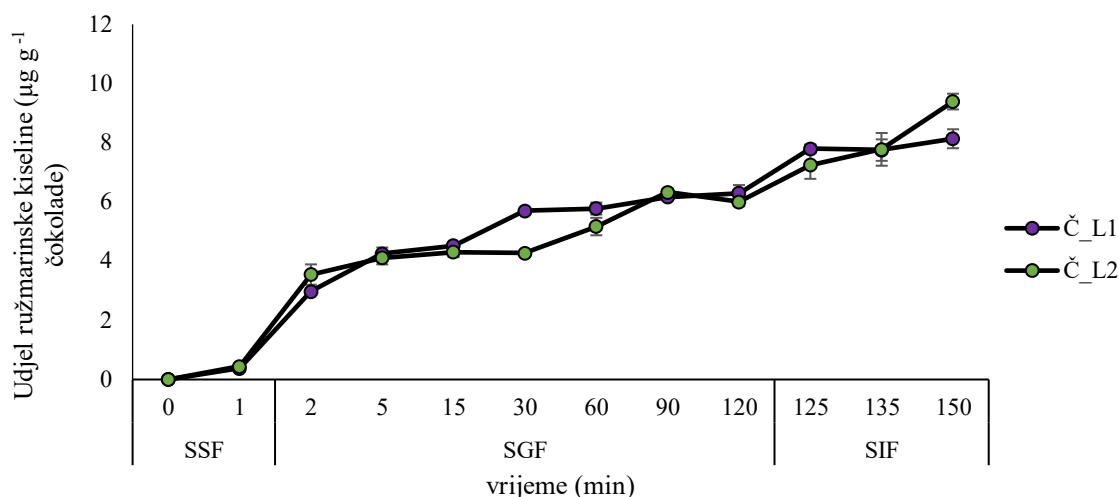
Tablica 40. Bioaktivni sastav čokolada

	Metilksantini i polifenolni spojevi podrijetlom iz kakaove mase (mg g ⁻¹ uzorka)			Polifenolni spojevi podrijetlom iz ekstrakta dobričice (μg g ⁻¹ uzorka)		
	Teobromin	Kafein	(-)- Epikatehin	Klorogenska kiselina	Ružmarinska kiselina	Rutin
Č_K	16,49±0,24 ^a	2,22±0,03	3,60±0,11	nd	nd	nd
Č_SR1	17,30±0,03 ^{bc}	2,56±0,04 ^{ab}	4,23±0,12 ^{abc}	50,97±0,31	36,89±0,22 ^a	49,98±0,53
Č_SR2	18,19±0,47	2,68±0,06 ^{ac}	4,46±0,01 ^a	48,22±0,07	36,27±0,09 ^a	55,61±1,43
Č_L1	17,37±0,10 ^{bd}	2,56±0,05 ^{bc}	4,16±0,07 ^{bd}	16,26±0,37	8,40±0,06	21,55±0,47 ^a
Č_L2	17,13±0,22 ^{acd}	2,42±0,04	4,04±0,12 ^{cd}	17,31±0,07	9,21±0,42	21,25±0,13 ^a

nd-nije detektirano; Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom u istome stupcu nisu statistički značajno različite ($p>0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.



Slika 89. Kinetika otpuštanja ružmarinske kiseline iz čokolada pripremljenih s inkapsulatom dobivenim sušenjem raspršivanjem u ustima (SSF), želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF)



Slika 90. Kinetika otpuštanja ružmarinske kiseline iz čokolada pripremljenih s liposomalnim inkapsulatom u ustima (SSF), želucu (SGF) i tankom crijevu (SIF)

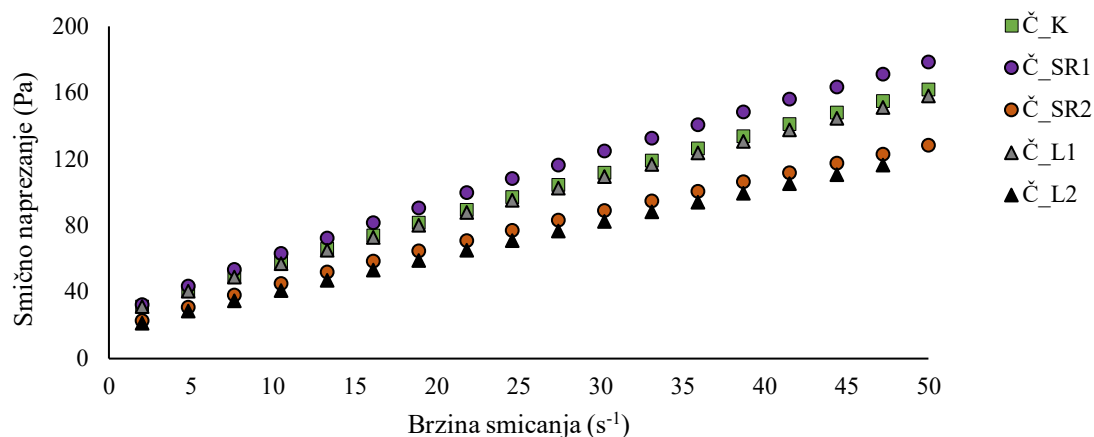
Teobromin, kao najzastupljeniji bioaktivni spoj iz skupine metilksantina u čokoladama, određen je u rasponu od 16,49 mg g⁻¹ (Č_K) do 18,19 mg g⁻¹ (Č_SR2), dok je udjel kafeina bio niži, u rasponu od 2,22 mg g⁻¹ (Č_K) do 2,68 mg g⁻¹ (Č_SR2). Kao najzastupljeniji polifenolni spoj iz skupine flavonola određen je (-)-epikatehin u rasponu od 3,60 mg g⁻¹ (Č_K) do 4,46 mg g⁻¹ (Č_SR2). Od polifenolnih spojeva dobričice, u čokoladama s dodatkom inkapsulata, identificirane su klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina i rutin. Udjel klorogenske kiseline, ružmarinske kiseline i rutina u čokoladama pripremljenima s dodatkom inkapsulata dobivenog sušenjem raspršivanjem iznosio je redom 50,97, 36,89 i 49,98 µg g⁻¹ u uzorku Č_SR1 i 48,22, 36,27 i 55,61 µg g⁻¹ u uzorku Č_SR2, a u čokoladama s dodatkom liposomalnog inkapsulata 16,26, 8,40 i 21,55 µg g⁻¹ u uzorku Č_L1 i 17,31, 9,21 i 21,25 µg g⁻¹ u uzorku Č_L2.

Dodatkom oba inkapsulata ekstrakta dobričice, neovisno o tehnici pripreme i načinu inkorporacije (Slika 26), postignuto je kontinuirano i kontrolirano otpuštanje ružmarinske kiseline. Razlika u otpuštanju ružmarinske kiseline kod čokolada obogaćenih dodatkom inkapsulata dobivenog sušenjem raspršivanjem (Č_SR1 i Č_SR2) uočena je u SGF-u u vremenu od 30 do 120 minuta te prvih 5 minuta u SIF-u.

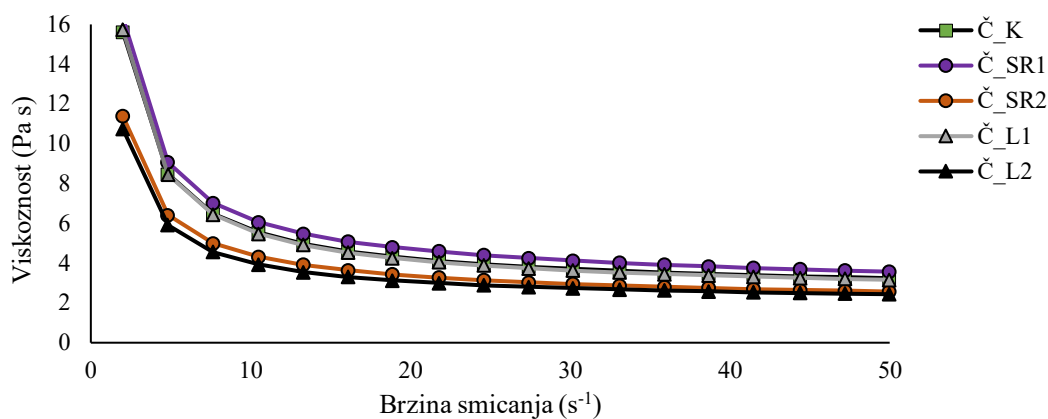
4.10.3. Određivanje reoloških svojstava čokolada

Krivulje tečenja i krivulje viskoznosti čokolada prikazane su na Slikama 91 i 92, dok su reološki parametri čokolada (Casson-ova granica tečenja i Casson-ova plastična viskoznost) prikazani u Tablici 41.





Slika 91. Krivulje tečenja novoformuliranih čokolada



Slika 92. Krivulje viskoznosti novoformuliranih čokolada

Tablica 41. Reološka svojstva novoformuliranih čokolada

Uzorak	Casson-ova granica tečenja (Pa) – τ_0	Casson-ova plastična viskoznost (Pa s) – η_C
Č_K	$13,1 \pm 0,81^{ab}$	$1,61 \pm 0,04^a$
Č_SR1	$13,23 \pm 0,63^{ac}$	$1,86 \pm 0,09$
Č_SR2	$9,13 \pm 0,42^d$	$1,36 \pm 0,05^{bc}$
Č_L1	$13,56 \pm 0,11^{bc}$	$1,53 \pm 0,07^{ab}$
Č_L2	$8,15 \pm 0,14^d$	$1,29 \pm 0,07^c$

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom u istome stupcu nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.



Uzorci čokolada su prema krivuljama tečenja i krivuljama viskoznosti pokazali ponašanje karakteristično za ne-newtonske pseudoplastične tekućine. Za određivanje svojstva tečenja uzoraka čokolada korišten je Casson-ov model pri čemu granica tečenja označava minimalno smično naprezanje potrebno da bi čokolada počela teći, a plastična viskoznost silu potrebnu za održavanje konstantnog protoka u čokoladi.

Granica tečenja za kontrolni uzorak čokolade (Č_K) iznosila je 13,1 Pa. Dodatak inkapsulata dobivenog sušenjem raspršivanjem i liposomalnog, direktno u čokoladnu masu (Č_SR1 i Č_L1), nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecao na promjenu granice tečenja čokolada (13,23 i 13,56 Pa). Statistički značajno ($p < 0,05$) niže granice tečenja (9,13 i 8,15 Pa) uočene su kod uzoraka čokolada kod kojih su inkapsulati bili prethodno homogenizirani u kakaovom maslacu koji je kao takav bio korišten za pripremu čokoladne mase (Č_SR2 i Č_L2). Casson-ova viskoznost za kontrolni uzorak (Č_K) iznosila je 1,61 Pa s te se nije statistički značajno ($p > 0,05$) razlikovala od vrijednosti utvrđene za uzorak Č_L1 (1,53 Pa s). Jedino statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje viskoznosti uočeno je kod uzorka Č_SR1 (1,86 Pa s). Važno je istaknuti da su čokolade pripremljene direktnim dodatkom inkapsulata u čokoladnu masu (Č_SR1 i Č_L1) bile statistički značajno ($p < 0,05$) viskoznije u odnosu na one kod kojih su inkapsulati bili prethodno homogenizirani u kakaovom maslacu koji je kao takav korišten za pripremu čokoladne mase (Č_SR2 i Č_L2).

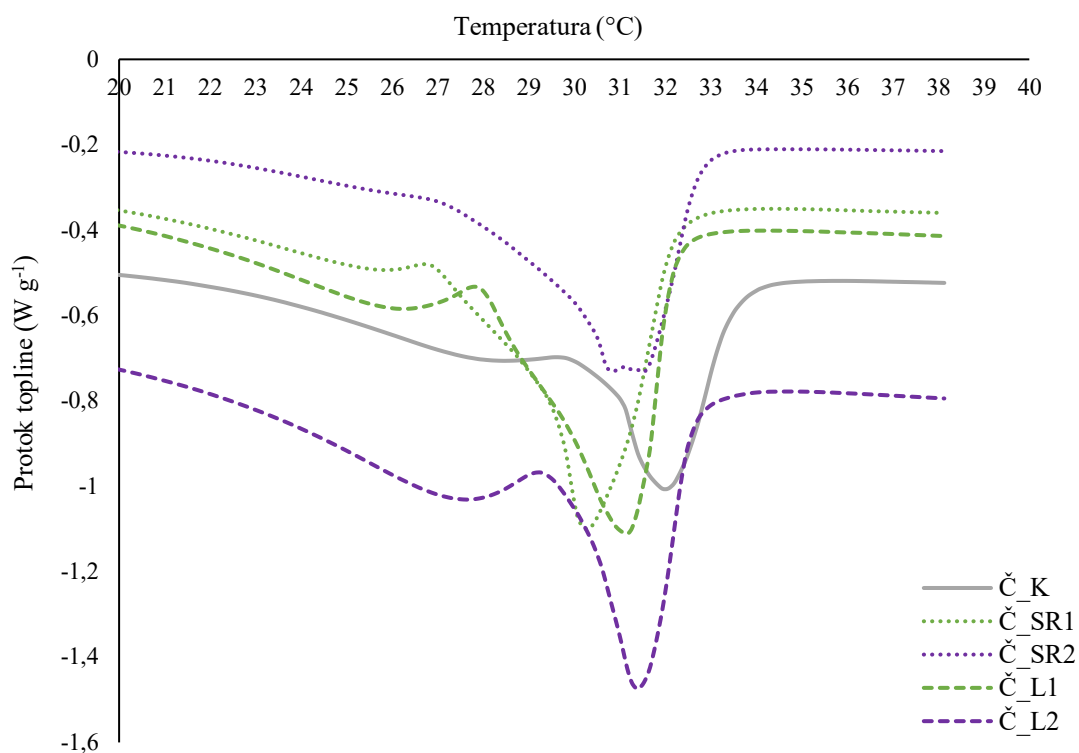
4.10.4. Određivanje svojstava taljenja i tvrdoće čokolada

Termogrami uzoraka čokolada u obliku DSC krivulja prikazani su na Slici 93, a parametri taljenja za oblik V (β_2) kakaovog maslaca prikazani su u Tablici 42. Od teksturalnih svojstava, određena je tvrdoća čokolada i rezultati su prikazani na Slici 94.

Na krivuljama taljenja svih uzoraka čokolada (DSC termogrami), primijećena su 2 endotermna pika. Prvi pik, koji je širok i blag kod svih uzoraka, primijećen je u rasponu temperatura maksimuma od 26 do 28 °C i predstavlja taljenje polimornog oblika IV (β'_1) kakaovog maslaca. Drugi pik, oštiji nego prvi, također je primijećen kod svih uzoraka u uskom rasponu temperatura maksimuma od 30,39 °C (Č_SR1) do 32,12 °C (Č_K) i predstavlja taljenje najpoželjnijeg polimornog oblika kakaovog maslaca - oblik V (β_2). S obzirom na dominaciju oblika V kakaovog maslaca u odnosu na druge, može se zaključiti da je proces temperiranja svih uzoraka čokolada proveden ispravno. Premda dodatak inkapsulata u čokolade nije rezultirao značajnom promjenom u temperaturi maksimuma taljenja oblika V kakaovog maslaca, promjene u entalpiji taljenja (ΔH_f) bile su značajnije te se pokazalo da je najmanja



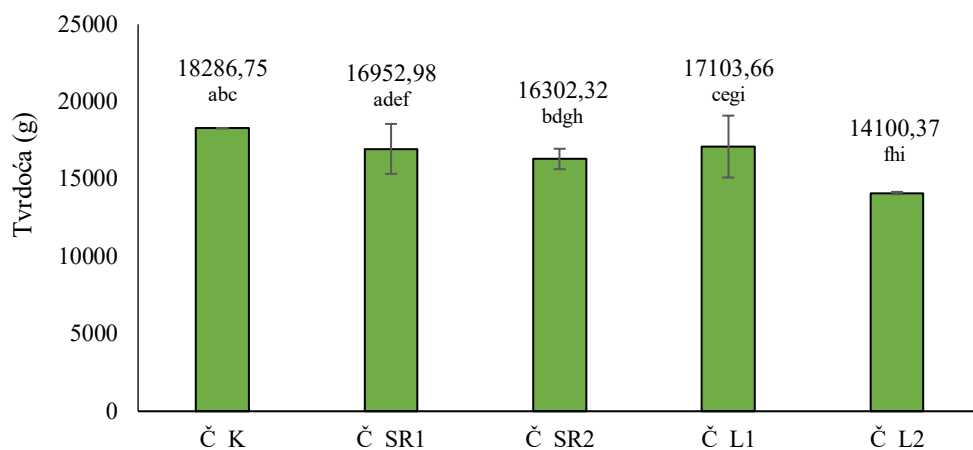
količina energije potrebna za taljenje kontrolnog uzorka Č_K ($17,27 \text{ J g}^{-1}$), a najveća za uzorak Č_SR1 ($26,12 \text{ J g}^{-1}$).



Slika 93. DSC termogrami novoformuliranih čokolada

Tablica 42. Rezultati DSC analize – maksimalna temperatura taljenja (T_t) i specifična entalpija taljenja (ΔH_t) za oblik V (β_2) kakaovog maslaca u uzorcima čokolada

Uzorak	T_t (°C)	ΔH_t (J g^{-1})
Č_K	32,12	17,27
Č_SR1	30,39	26,12
Č_SR2	31,59	21,24
Č_L1	31,56	18,86
Č_L2	31,20	22,65



Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

Slika 94. Tvrdoća novoformuliranih čokolada

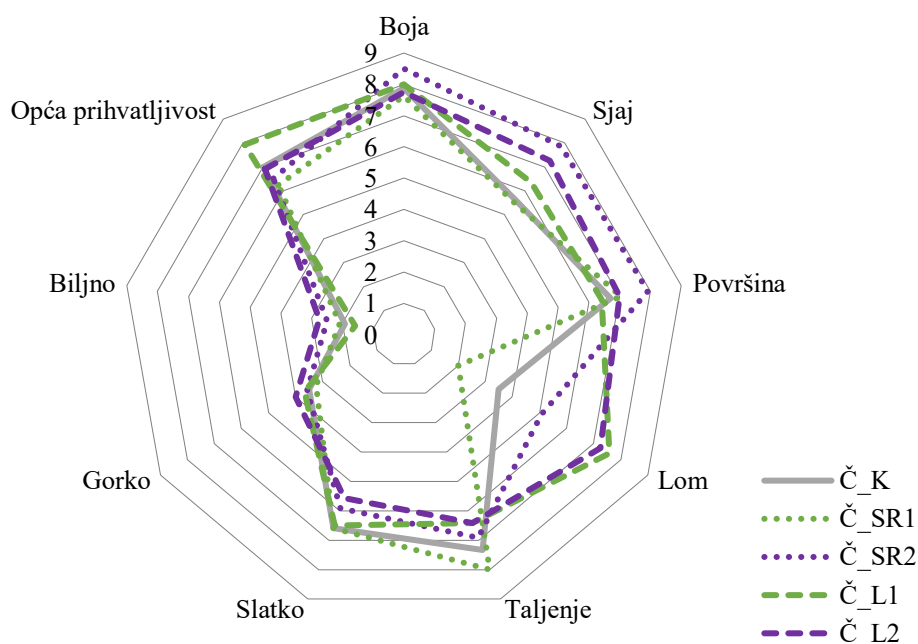
Tvrdoća kontrolnog uzorka čokolade (Č_K) iznosila je 18286,75 g, a statistički značajno ($p < 0,05$) manja tvrdoća uočena je kod čokolade pripremljene dodatkom liposomalnog inkapsulata (Č_L2) kod kojeg je tvrdoća iznosila 14100,37 g te je time i najosjetljiviji na lomljenje od svih uzoraka.

4.10.5. Određivanje senzorskih svojstava čokolada

Na Slici 95 je fotografija samo jedne novoformulirane čokolade budući da se vanjskim izgledom čokolade nisu razlikovale. Rezultati senzorske analize čokolada, koji su uključivali ocjenjivanje izgleda (boja, sjaj i površina), akustičnosti (lom), teksture (taljenje), okusa (slatko, gorko i biljno) i opću prihvatljivost, prikazani su na Slici 96.



Slika 95. Primjer formulirane čokolade



Slika 96. Rezultati senzorske analize novoformuliranih čokolada

Sve čokolade ocijenjene su visokim ocjenama za boju koje su bile u uskom rasponu od 7,6 (Č_SR1) do 8,5 (Č_SR2). Najnižim intenzitetom sjaja ocijenjeni su kontrolni uzorak čokolade (Č_K) i uzorak Č_SR1, s ocjenama od 5,6 i 5,5, dok je najviši intenzitet sjaja određen u uzorku Č_SR2 s ocjenom od 7,8. Također, isti uzorak (Č_SR2) bio je ocijenjen s najvišom ocjenom za izgled površine (7,9). Općenito, uzorak Č_SR2 bio je ocijenjen s najvišim ocjenama što se tiče parametara izgleda čokolada. Čokoladama pripremljenima s dodatkom liposomalnog inkapsulata (Č_L1 i Č_L2) ocijenjen je najviši intenzitet loma, s ocjenama od 7,6 i 7,3. Najintenzivnije taljenje ocijenjeno je u uzorku ČSR_1 (ocjena 8,0), a najmanje intenzivno s jednakim ocjenama (6,4), u uzorcima pripremljenima s liposomalnim inkapsulatom (Č_L1 i Č_L2).

Svi uzorci čokolada ocijenjeni su kao umjereno slatki, u uskom rasponu ocjena od 5,6 (Č_L2) do 6,6 (Č_SR1 i Č_K) te kao blago gorki, u uskom rasponu ocjena od 3,3 (Č_SR1) do 4,0 (Č_L2). Biljni okus je u svim uzorcima čokolada ocijenjen s vrlo niskim ocjenama u rasponu od 1,6 (Č_L1) do 2,8 (Č_L2). Sve čokolade bile su dobro prihvaćene od strane senzorskog panela jer su se ocjene za opću prihvatljivost kretale od 6,3 (Č_SR1) do 7,9 (Č_L1).

5. Rasprava

U ovome radu, istraživana je bioaktivni potencijal tradicionalne biljne vrste dobričice (*Glechoma hederacea* L.), koja, iako se generacijama koristi u narodnoj medicini, nije dovoljno istraжена u pogledu bioaktivnog sastava i bioloških učinaka. Uzorci dobričice sakupljeni su na području kontinentalne Hrvatske u fazi cvjetanja te im je određen osnovni kemijski sastav, uključujući udjel suhe tvari, proteina, ulja, pepela i prehrambenih vlakana velike molekulske mase. U cilju detaljnijeg uvida u kemijski sastav, uzorcima je određen sastav masnih kiselina i sastav makro- i mikroelemenata. Istraživanje se nastavilo u smjeru karakterizacije bioaktivnog sastava istih uzoraka, s naglaskom na polifenolne spojeve, te su se u svrhu maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti istih optimirale konvencionalna tehnika ekstrakcije potpomognuta zagrijavanjem, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija subkritičnom vodom, koristeći metodu odzivnih površina i centralno kompozitni dizajn. Učinkovitost ekstrakcija pratila se spektrofotometrijski određivanjem udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta dobivenih ekstrakata te tekućinskom kromatografijom (HPLC-PDA i LC-MS/MS) u cilju kvantifikacije pojedinačnih polifenolnih spojeva. Ekstrakt najizraženijeg bioaktivnog potencijala bio je podvrgnut analizi bioloških učinaka koristeći *in vitro* i *in vivo* metodologiju. *In vitro* metodologija uključivala je određivanje citotoksičnog djelovanja ekstrakta na humanim staničnim linijama probavnog sustava, kao i na glavne predstavnike humane mikrobiote. Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta odredilo se ispitivanjem stupnja karbonilacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma i praćenjem indukcije slobodnih radikala u navedenim staničnim linijama, dok je genoprotektivni učinak ispitan na modelnom genetičkom materijalu te na genomu navedenih staničnih linija. Utjecaj ekstrakta dobričice na stupanj oksidacijskog stresa *in vivo* bio je praćen kroz parametre karbonilacije proteina, lipidne peroksidacije, određivanjem aktivnosti endogenog enzimatskog antioksidansa superoksid dismutaze i određivanjem koncentracije neenzimatskog endogenog antioksidansa glutaciona, u homogenatima bubrega, jetre i slezene eksperimentalnih životinja (štakori), a za procjenu primarnih oštećenja DNK u stanicama istih organa i krvi koristila se standardna izvedba komet testa.

Nakon detaljne analize bioaktivnog sastava i bioloških učinaka ekstrakta dobričice, isti se inkapsulirao sušenjem raspršivanjem i liposomalnom tehnikom. Kao osnovni sastojak nosača za inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem koristila se guar guma u kombinaciji s nutrizom, ksilanom, hidrolizatom kolagena, mucinom i karboksimetil celulozom, a liposomalna



inkapsulacija proveda se koristeći fosfatidilkolin visoke čistoće. Uz određivanje inkapsulacijske učinkovitosti, retencija polifenola dobričice u inkapsuliranim sustavima pratila se i *in vitro* digestijom, odnosno simulacijom probave istih u želucu i tankom crijevu. Veličina inkapsulata odredila se odgovarajućom metodom dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, morfološke karakteristike inkapsulata pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) i mikroskopijom atomskih sila (AFM), dok se infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR) ispitala prisutnost funkcionalnih veza unutar inkapsulata. Inkapsulatima sušenim raspršivanjem dodatno se ispitala močivost, kontaktni kut vode, nasipna gustoća, svojstva tečenja i kohezivnosti, a liposomalnim inkapsulatima indeks polidisperzije i zeta potencijal. Liposomalni inkapsulat ekstrakta dobričice nadalje je ispitan *in vivo* metodologijom određujući iste parametre oksidacijskog stresa kao i u slučaju ekstrakta dobričice. U konačnici, inkapsulati sušeni raspršivanjem i liposomalni inkapsulati korišteni su za formulaciju inovativnih funkcionalnih čokolada. Novorazvijenim čokoladama analiziran je bioaktivni sastav, teksturalna i reološka svojstva, svojstva taljenja i senzorsko ocjenjivanje.

5.1. Kemijski sastav uzoraka dobričice

U cilju što bolje karakterizacije sastava dobričice, uzorci su sakupljeni na 7 lokacija na području kontinentalne Hrvatske unutar Krapinsko-zagorske županije (uzorak D1), Grada Zagreba (uzorak D2), Bjelovarsko-bilogorske županije (uzorak D3), Varaždinske županije (uzorci D4 i D5) i Brodsko-posavske županije (uzorci D6 i D7). Prikupljenim uzorcima dobričice određen je kemijski sastav koristeći standardne AOAC metode, a rezultati su pokazali određene razlike ovisno o staništu, što je i očekivano budući da su uzorci sakupljeni na međusobno udaljenim lokacijama. Kemijski sastav biljaka podložan je utjecaju vrste i sastava tla, klimatskih uvjeta, nadmorske visine, a i vremenu berbe te uvjetima procesiranja i skladištenja (Altaf i sur., 2019). Ipak, bez obzira na različite udjele pojedinih komponenata, u ovome istraživanju, u svim uzorcima dobričice određen je visoki udjel netopljivih prehrambenih vlakana i proteina te nizak udjel ulja. Visoki udjel netopljivih prehrambenih vlakana velike molekulske mase u suhoj tvari prikupljenih uzoraka dobričice može se pripisati značajnom udjelu celuloze, strukturnom polisaharidu, koja čini oko 50 % ukupnog ugljika u biljkama (Barros i sur., 2011). Udjel proteina kod uzorka dobričice D5 (23,12 % s. tv.), s područja Varaždinske županije, bio je čak u rasponu udjela proteina zrnatih mahunarki (24,0 – 26,1 %), koje se smatraju bogatim izvorima proteina (Iqda i sur., 2006), što je također u skladu s rezultatima Jo i suradnika (20001) koji su u dobričici iz Južne Koreje odredili udjel proteina od 20,28 %. Zanimljivo je istaknuti da se



uzorci D6 i D7, čije su lokacije sakupljanja blizu unutar područja Brodsko-posavske županije, nisu međusobno značajno ($p>0,05$) razlikovali u udjelu proteina, kao i u odnosu na uzorke sakupljene s udaljenijih lokacija, točnije s uzorkom D1, s područja Krapinsko-zagorske županije, i uzorka D3, sakupljenog u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji. Wang i suradnici (2003) objavili su prisutnost lektina, nazvanog Gleheda, u listovima dobričice s područja Belgije, koji ima izražajna insekticidna svojstva i koji je predstavljao čak i do 35 % ukupnih proteina. Istražujući kemijski sastav dobričice s područja Južne Koreje, Jo i suradnici (2001) odredili su sličan makromolekulski sastav, kao u ovome istraživanju, te je uz udjel proteina, vrlo sličan bio i udjel pepela (15,78 %) i ulja (3,96 %). U ovome istraživanju, udjeli pepela i ulja u uzorcima dobričice nisu se previše razlikovali ovisno o mjestu sakupljanja te se tako, na primjer, njihovi udjeli u uzorku D1, sakupljenog na području Krapinsko-zagorske županije, nisu statistički značajno ($p>0,05$) razlikovali u odnosu na udjele u uzorcima D2, D5, D6 i D7, sakupljeni redom s područja Grada Zagreba, Varaždinske županije i Brodsko-posavske županije. Za biljne vrste iz porodice Lamiaceae nije očekivan visoki udjel ulja, ali u odnosu na dobričicu, kadulja, matičnjak, timijan, ružmarin, vrisak i bosiljak mogu sadržavati i do oko 6 – 9 % ulja, ali manji udjel proteina do oko 5 – 8 % (Tomescu i sur., 2015).

Nakon gravimetrijskog određivanja udjela ulja u uzorcima dobričice primjenom Soxhlet ekstraktora, u izdvojenog lipidnoj frakciji određen je sastav masnih kiselina i uočeno je da su nezasićene masne kiseline bile zastupljenije nego zasićene, i to najviše oleinska, linolna i α -linolenska kiselina, dok je od zasićenih masnih kiselina većinom dominirala palmitinska kiselina. Palmitinska, linolna i α -linolenska kiselina smatraju se glavnim masnim kiselinama u listovima različitih biljaka iz porodice Lamiaceae (Cacan i sur., 2018). Uzorak D7, s područja Brodsko-posavske županije, pokazao je najveću raznolikost masnih kiselina u svom sastavu te je bio jedini uzorak s identificiranom behenskom kiselinom (6,52 % m.k.), a uz uzorke D1, s područja Krapinsko-zagorske županije, i D4, s područja Varaždinske županije, jedini s lignocerinskom kiselinom (13,73 % m.k.), sa statistički značajno ($p<0,05$) većim njezinim udjelom u odnosu na uzorke D1 i D4 (2,46 i 3,22 % m.k.). U istraživanju Barros i suradnika (2011), kao najzastupljenija masna kiselina u dobričici, podrijetlom iz sjeveroistočnog Portugala, određena je oleinska kiselina (35,12 %), zatim α -linolenska kiselina (27,87 %), palmitinska kiselina (12,23 %) i linolna kiselina (8,15 %). Jo i suradnici (2001) objavili su da je linolenska kiselina (45,18 %) najzastupljenija masna kiselina dobričice s područja Južne Koreje, potom palmitinska (29,14 %), linolna (14,59 %), oleinska (5,19 %) i behenska (2,41 %) kiselina, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.



S ciljem detaljnog uvida u kemijski sastav, prikupljenim uzorcima dobričice nadalje su određeni i udjeli pojedinačnih mineralnih tvari. Prema rezultatima analize makroelemenata prikupljenih uzoraka, vidljivo je da dobričica sadrži visoke udjele kalija (K) i kalcija (Ca), koji su se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$) ovisno o prirodnom staništu. Najmanji udjel kalija određen je u uzorku D1 (14,4 mg g⁻¹ s. tv.), sakupljenog na području Krapinsko-zagorske županije, a najviši u uzorku D4 (29,8 mg g⁻¹ s. tv.), iz Varaždinske županije, dok je najmanji udjel kalcija određen u uzorku D2 (7,8 mg g⁻¹ s. tv.), sakupljenog na području grada Zagreba, a najviši u uzorku D3 (14,8 mg g⁻¹ s. tv.), iz Bjelovarsko-bilogorske županije. Unos kalija pridonosi smanjenju krvnog tlaka i time smanjuje rizik od moždanog udara i koronarnih bolesti srca te ima zaštitni učinak na gubitak koštane mase povezan sa starenjem i na smanjenje bubrežnih kamenaca, dok se kalcij ističe kao “supernutrijent” zbog uloge u smanjenju rizika od osteoporoze, hipertenzije, pojave raka debelog crijeva, kao i drugih poremećaja (Weaver, 2013; Miller i sur., 2001). Također, ako se koristi u obliku biljne infuzije, dobričica još uvijek može poslužiti kao bogat izvor kalija budući da on pripada skupini visoko ekstrahiranih elemenata (Juranović Cindrić i sur., 2013). Znatno niži udjel kalija (5,98 mg g⁻¹) i kalcija (2,40 mg g⁻¹), nego u ovome istraživanju, određen je u uzorku dobričice s područja Južne Koreje, u kojem je natrij bio zastupljeniji (6,50 mg g⁻¹) (Jo i sur., 2001). Nadalje, u ovome istraživanju, po statistički značajno višem ($p < 0,05$) udjelu željeza (Fe) u odnosu na druge uzorke, istaknuli su se uzorci D1 (1,4 mg g⁻¹ s. tv.) i D2 (1,3 mg g⁻¹ s. tv.), čiji su udjeli u rasponu udjela željeza u ljekovitim biljkama koje se tradicionalne koriste u liječenju anemije, odnosno u rasponu udjela od 0,7 mg g⁻¹, određen u listovima i stabljikama ricinusa, do 2,7 mg g⁻¹, određen u listovima indijskog hrasta (Koné i sur., 2012).

Među mikroelementima, prema udjelu u dobričici, istaknuli su se vanadij (V) i krom (Cr). Mala količina vanadija, uobičajenog dnevnog unosa od 0,01 – 0,02 mg, unesena hranom i vodom za piće, u obliku vanadij(V) oksida i vanadij(IV) oksida, ili češće kao vanadat (H₂VO₄⁻), korisna je za zdravlje, dok prekomjeren unos može biti toksičan. Spojevi vanadija pokazali su se korisnima u liječenju dijabetesa, u terapiji kancerogenih bolesti te u borbi protiv zaraznih bolesti (Rehder, 2020). Ljekovite biljke poznate su po svojstvu da mogu apsorbirati i pohranjivati različite minerale, uključujući i krom, pa tako i dobričica, te mogu poslužiti kao dodaci prehrani za sprječavanje nedostatka kroma koji inače može uzrokovati razne kardiovaskularne poremećaje, aterosklerozu, endokrine bolesti, perifernu neuropatiju, itd. (Lovkova i sur., 2001). Zanimljivo je istaknuti da su se uzorci D1 i D2, kao i slučaju željeza, statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$) od drugih po višem udjelu vanadija (3,4 i 3,8 μg g⁻¹ s. tv.) i kroma (3,3 i



2,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ s. tv.), kao i po statistički značajno višim udjelima ($p < 0,05$) kobalta (0,5 i 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ s. tv.), arsena (0,4 i 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ s. tv.), molibdena (1,2 i 1,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ s. tv.), kositra (0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ s. tv.) i olova (1,0 i 1,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ s. tv.). Udjel mikroelemenata, isto kao i makroelemenata, ovisio je o prirodnom staništu dobričice, što je i očekivano pošto na mineralni sastav biljaka značajno utječu vrsta tla, način gnojidbe i okolišni uvjeti, kao što su slanost tla, suša, temperatura, svjetlosni uvjeti, itd. (Martínez-Ballesta i sur., 2010), a oni nisu jednaki na svim staništima. Čak i kod uzoraka D4 i D5, sakupljenih unutar područja Varaždinske županije, uočene su statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u sastavu makro- i mikroelemenata, uz iznimku samo u udjelima željeza, fosfora, selena, kositra, žive i titanija. Veća sličnost među uzorcima u mineralnom sastavu sakupljenih s područja iste županije, točnije s područja Brodsko-posavske županije, uočena je kod uzoraka D6 i D7, koji se nisu međusobno statistički značajno ($p > 0,05$) razlikovali po udjelima željeza, fosfora, vanadija, kobalta, arsena, selena, žive i titanija.

Ne postoji standard koji se odnosi na dopušteni udjel metala u medicinskim biljnim sirovinama, a Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization* – WHO) navodi samo maksimalno dopuštene količine za arsen (1,0 mg kg^{-1}), kadmij (0,3 mg kg^{-1}) i olovo (10 mg kg^{-1}) (Zinicovscaia i sur., 2020). U ovome istraživanju, udjel navedenih elemenata u svim uzorcima dobričice bio je ispod dopuštenih razina. Što se tiče ostalih mikroelemenata (Cu, Ni, Hg, Mn, Zn, Mo, Co i Sb), njihov udjel bio je unutar sigurnih granica i ispod referentnih vrijednosti za toksični učinak (Stanojkovic-Sebic i sur., 2014).

5.2. Optimiranje pojedinih tehnika ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice

Ekstrakcija je ključan korak u izolaciji polifenolnih spojeva, a zbog kompleksnosti i raznolikosti polifenolnih spojeva u pogledu polarnosti, kemijske strukture te kompleksnosti matriksa u kojem se nalaze, ne postoji standardni protokol za njihovu ekstrakciju (Plaza i sur., 2018). Polifenolni spojevi mogu se uspješno ekstrahirati koristeći konvencionalne tehnike ekstrakcije koje se temelje na ekstrakcijskom kapacitetu različitih otapala, primjeni topline i/ili miješanju uzorka s otapalom pri čemu je polarnost ciljanog spoja najvažniji čimbenik za izbor otapala (Sridhar i sur., 2021; Azmir i sur., 2013). Neki od nedostataka konvencionalnih tehnika ekstrakcija su dugo vrijeme ekstrakcije, niska selektivnost ekstrakcije, potreba za skupim otapalima visoke čistoće te termalna degradacija termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013). U cilju savladavanja navedenih nedostataka razvijaju se inovativne tehnike ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem, ekstrakcija



potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija subkritičnom vodom, itd. (Sridhar i sur., 2021). U ovome radu, u svrhu postizanja maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti polifenolnih spojeva dobričice, istraživana je konvencionalna tehnika ekstrakcije potpomognuta zagrijavanjem (HAE), a od inovativnih tehnika istraživane su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) i ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE).

Konvencionalna ekstrakcija potpomognuta zagrijavanjem najčešće je primjenjivana tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva na industrijskoj razini, a i u analitičkim eksperimentima, zbog jednostavnosti izvedbe i lako dostupne opreme, a upravo je i to tehnika koja se najčešće koristi u kućanstvima za pripremu biljnih infuzija, uz vodu kao ekstrakcijsko otapalo. Kod ove tehnike, primijenjena toplina povećava poroznost stanica biljnog materijala i oštećuje staničnu stijenku čineći je tako propusnijom za ekstrakcijsko otapalo (Chino i sur., 2019). Više temperature tijekom ekstrakcije mogu djelovati pozitivno na povećavanje udjela ekstrahiranih spojeva i brzinu ekstrakcije jer viša temperatura daje veću kinetičku energiju ekstrahiranim spojevima koji se kreću kroz biljni matriks, što olakšava difuziju i ekstrakciju (Li, 2023), ali temperaturu je, uz vrijeme ekstrakcije, potrebno optimirati kako bi se izbjegla degradacija termolabilnih bioaktivnih spojeva. Kod pripreme ekstrakata listova, korijena i cvjetova biljnih materijala, preporuka je koristiti kraće vrijeme ekstrakcije, odnosno oko 15 minuta u kipućoj vodi, za razliku od pripreme ekstrakata grana i kora drveća gdje se ekstrakcija može provoditi i do 1 sat u kipućoj vodi (Bitwell i sur., 2023).

Mikrovalovi su neionizirajuća elektromagnetska zračenja frekvencije od 300 MHz do 300 GHz koji su u elektromagnetskom spektru smješteni između radiofrekventnih valova i infracrvenih zraka (Routray i Orsat, 2012). Tijekom ekstrakcije bioaktivnih spojeva pomoću mikrovalova, mikrovalovi brzo predaju energiju otapalu, a i biljnom matriksu pri čemu dolazi do zagrijavanja vode prisutne u biljnoj stanici (*in situ* voda) što uzrokuje njeno isparavanje i stvara veliki pritisak na staničnu stijenku koja potom slabi i puca. Puknuće stanične stijenke može olakšati prijenos mase otapala u biljne materijale te bioaktivnih spojeva u otapalo omogućujući na taj način učinkovitu ekstrakciju, što posljedično pridonosi većoj ekstrakcijskoj učinkovitosti (Bagade i Patil, 2019; Zhang i sur., 2011).

Subkritična voda definira se kao vruća voda na dovoljno visokom tlaku da se održi u tekućem stanju na kritičnoj temperaturi između 100 °C (temperatura ključanja vode) i 374 °C (kritična temperatura vode) i pri kritičnom tlaku (1 – 22,1 MPa) (Zhang i sur., 2019). S porastom temperature, dielektrična konstanta, viskoznost i površinska napetost vode se smanjuju, dok se koeficijent difuzije poboljšava (Cheng i sur., 2021). Dielektrična konstanta vode na 25 °C i pri



atmosferskom tlaku iznosi 80, a porastom temperature na 250 °C i pri tlaku od 25 bar, vrijednost dielektrične konstante se smanji na 25, što je u rasponu vrijednosti dielektričnih konstanti za metanol ($\epsilon = 33$) i etanol ($\epsilon = 24$). U takvim uvjetima voda je po nekim svojstvima slična organskim otapalima te je pogodna za ekstrakciju manje polarnih spojeva. Energija koju dobiva subkritična voda može prekinuti interakciju između adhezije (otopljena tvar-matriks) i kohezije (otopljena tvar-otopljena tvar) smanjenjem energije aktivacije potrebne za proces desorpcije, dok povišeni tlak rezultira prodiranjem vode u biljni matriks kroz pore, što je nemoguće postići pod atmosferskim tlakom (Zhang i sur., 2019).

Kako bi se postigla maksimalna ekstrakcijska učinkovitost spojeva od interesa, uz smanjenje troškova i vremena, potrebno je provesti proces optimiranja svake tehnike ekstrakcije zasebno (Bezerra i sur., 2008). Tradicionalno se optimiranje provodilo univarijantnim metodama pri čemu se mijenjala vrijednost jednog parametra ekstrakcije, dok bi se vrijednosti ostalih održavale konstantnima. Glavni nedostatak ovog pristupa, uz potreban veliki broj eksperimenata, je nemogućnost uzimanja u obzir međusobne interakcije različitih varijabli (Bezerra i sur., 2008; Ferreira i sur., 2007). Stoga su se razvile multivarijantne metode optimiranja procesa, a jedna od najčešće korištenih je metoda odzivnih površina koja predstavlja skup statističkih i matematičkih metoda temeljenih na pronalasku polinomialne jednadžbe koja dovoljno dobro opisuje i predviđa ponašanje eksperimentalnih podataka (Bezerra i sur., 2008; Baş i Boyacı, 2007). U ovome istraživanju, koristeći metodu odzivnih površina i centralno kompozitni dizajn, kreirani su matematički modeli koji su uspješno primijenjeni u optimiranju svih triju istraživanih tehnika. Dobivene eksperimentalne vrijednosti za udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakata bile su vrlo slične vrijednostima predviđenima korištenim matematičkim modelima s vrlo niskim relativnim pogreškama. Kod svih tehnika, kao optimalan omjer uzorak/otapalo određen je 0,01 g mL⁻¹, dok su vrijeme i temperatura varirali ovisno o tehnici: za HAE 10 minuta i 100 °C, za MAE 4,93 minute i 90 °C te za SWE 5 minuta i 200 °C. Najveća ekstrakcijska učinkovitost polifenolnih spojeva, a time i antioksidacijski kapacitet ekstrakata, postignuti su koristeći SWE tehniku. Ekstrakcijske učinkovitosti HAE i MAE tehnika u pogledu udjela ukupnih polifenola nisu bile značajno različite, pri čemu je MAE tehnika postigla jednaku ekstrakcijsku učinkovitost u dvostruko kraćem vremenskom periodu. Prema istraživanju Arruda i suradnika (2017), temperature iznad 75 °C mogu uzrokovati degradaciju polifenolnih spojeva ili njihovu interakciju s drugim spojevima matriksa usporavajući njihovu ekstrakciju. U ovome



istraživanju, optimalne temperature bile su više, no ekstrakcija se provodila u kratkom vremenskom periodu, što nije rezultiralo degradacijom polifenola.

Gwiazdowska i suradnici (2022) istraživali su ekstrakciju polifenolnih spojeva dobričice koristeći superkritični CO₂ s varijacijom temperature (40, 50 i 60 °C), a pri konstantnom tlaku (250 bar). Zbog nepolarne prirode CO₂ te u cilju povećanja ekstrakcijske učinkovitosti polifenolnih spojeva, korišten je metanol kao suotapalo. U ekstraktu dobivenim pri najnižoj temperaturi (40 °C) određen je značajno viši udjel ukupnih polifenola (138,33 mg EGK g⁻¹ ekstrakta) u odnosu na druga dva ekstrakta (43,00 i 46,00 mg EGK g⁻¹ ekstrakta) te je zaključeno da povećanje temperature ima negativan učinak na topljivost polifenola tijekom ekstrakcije zbog smanjenja gustoće otapala. Grabowska i suradnici (2022) provodili su ekstrakciju polifenolnih spojeva dobričice koristeći ekstrakciju uz refluks, infuziju, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i Soxhlet ekstrakciju uz varijaciju vremena (15 minuta – 2 sata) i otapala (voda i etanol). Vodeni ekstrakti bili su okarakterizirani višim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta, određenog DPPH i FRAP metodama, u odnosu na etanolne ekstrakte. Najviši antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom (301,26 μM Fe²⁺ g⁻¹ s. tv.) detektiran je u infuziji pripremljenoj tijekom 30 minuta, a najviši antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom (167,40 μM Trolox g⁻¹ s. tv.), također u infuziji, ali pripremljenoj kroz 1 sat.

5.3. Polifenolni sastav uzoraka dobričice

Fenolni spojevi su organski spojevi koji sadrže jedan ili više aromatskih prstena u svojoj strukturi na koji su vezane jedna ili više hidroksilnih grupa. Široko su rasprostranjena grupa sekundarnih biljnih metabolita s preko nekoliko tisuća poznatih kemijskih struktura, od onih jednostavnijih kao što su fenolne kiseline te do onih kompleksnijih kao što su tanini (Alara i sur., 2021). Fenolni spojevi se sintetiziraju tijekom normalnog razvoja biljke, ali i kao odgovor na različite stresne čimbenike (Haminiuk i sur., 2012). Fenolni spojevi štite biljke od različitih biotskih i abiotskih stresova, djeluju kao jedinstveni UV filteri, imaju ulogu signalnih molekula, kao i detoksikacijskih i antimikrobnih obrambenih spojeva. Također, imaju ulogu u otpornosti biljke na sušu te na toplinsku aklimatizaciju biljaka i otpornost na smrzavanje (Panche i sur., 2016). Vrlo često se kao sinonim za „fenolne spojeve“ koristi izraz „polifenolni spojevi“, ali polifenolni spojevi podrazumijevaju strukturu s najmanje dva fenolna prstena. Bate-Smith i Swain (1962) su prvi opisali polifenolne spojeve kao fenolne spojeve topljive u vodi s molekulskom masom u rasponu od 500 do 3 000 Da te da uz uobičajene fenolne reakcije, imaju



posebna svojstva kao što je mogućnost precipitacije alkaloida, želatine i drugih proteina iz otopina. Kasnije su Haslam i Cai (1994) promijenili definiciju polifenolnih spojeva koja podrazumijeva od 12 do 16 fenolnih hidrosilnih grupa na 5 – 7 aromatskih prstenova na 1000 Da relativne molekulske mase. Prema najnovijoj definiciji, polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji potječu isključivo iz fenilpropanoida sintetiziranih od šikimata i/ili poliketidnih putova koji sadrže više od jednog fenolnog prstena lišenih bilo koje funkcionalne skupine koja se temelji na dušiku u njihovom najosnovnijem strukturnom izrazu (Quideau i sur., 2011). Najčešće podjela polifenola je ona prema kemijskoj strukturi i koja uključuje 5 grupa polifenolnih spojeva – flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni, lignani i ostali (Grosso i sur., 2014).

Dobričica pripada porodici usnača (Lamiaceae) za koju je karakterističan visoki udjel fenolne kiseline – ružmarinske kiseline. Ružmarinsku kiselinu prvi puta su izolirali 1958. godine Scarpati i Oriente iz ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) što je i definiralo njezino ime. Ružmarinska kiselina je ester kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenillaktične kiseline (Sik i sur., 2019). U ovome istraživanju, jednaki profil polifenolnih spojeva ekstrakata dobričice, uključujući uz ružmarinsku kiselinu, također i klorogensku, kriptoklorogensku i kafeinsku kiselinu te rutin, dobiven je primjenom MAE i HAE tehnika, dok je u ekstraktima dobivenim SWE tehnikom uočen novi spoj koji nije identificiran. Dominantan spoj (Slika 21b, pik označen kao "F4"), uočen samo u SWE ekstraktima, podvrgnut je LC-MS/MS analizi koja je rezultirala $[M-1]^{-1}$ ionom na m/z 239 te koji je u MS/MS rezultirao dvama pikovima na m/z 147 i 193 (Slika 25), ali navedeni podaci se nisu mogu iskoristiti za uspješnu identifikaciju jer potrebne informacije nedostaju u dostupnoj literaturi. Iako su molekulska formula i struktura dominantnog spoja u SWE ekstraktima ostale prilično nejasne i nepoznate, očito je da je SWE tehnika rezultirala formiranjem novog antioksidansa. Ova pojava novih spojeva u ekstraktu koji nisu bili prisutni u prirodnom matriksu prije ekstrakcije, u literaturi se opisuje kao neoformacija (Gilbert-López i sur., 2017). Novi spoj mogao je nastati kao produkt razgradnje zbog primijenjene visoke temperature (200 °C) tijekom SWE tehnike koji je zadržao fenolnu strukturu, a time i antioksidacijski kapacitet. Druga mogućnost jest da je nastao kao produkt Maillard-ovih reakcija i reakcija karamelizacije, procesima koji se događaju tijekom ekstrakcije subkritičnom vodom (Plaza i sur., 2010). Također, u ekstraktima dobivenim SWE tehnikom, udjeli ciljanih polifenolnih spojeva (ružmarinska, klorogenska, kriptoklorogenska i kafeinska kiselina i rutin) bili su statistički značajno ($p < 0,05$) niži u odnosu na MAE i HAE ekstrakte, moguće zbog njihove degradacije uslijed visoke temperature, a i neprikladnosti SWE tehnike



za njihovu ekstrakciju zbog smanjenja dielektrične konstante vode, koja kao takva nije više prikladna za njihovu ekstrakciju. Neoformacija uslijed primjene SWE tehnike prvi puta je zabilježena u radu Plaza i suradnika (2010) na uzorcima mikroalgi, makroalgi i biljaka praćena povećanjem antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata, kao i u ovome istraživanju. Neoformacija primjenom SWE tehnike navedena je i u radu Mandura Jarić i suradnika (2023b) tijekom ekstrakcije polifenolnih spojeva iz trave ive (*Teucrium montanum* L.)

Nadalje, u ovome istraživanju, MAE tehnika rezultirala je najvećom ekstrakcijskom učinkovitošću ciljanih polifenolnih spojeva kod gotovo svih uzoraka. Izuzetci su uzorci D1 i D5 u slučaju kafeinske kiseline te uzorak D3 u slučaju klorogenske kiseline gdje nije uočena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u ekstrakcijskoj učinkovitosti HAE i MAE tehnika za navedene spojeve, dok je kod uzorka D2 HAE tehnika čak bila uspješnija u ekstrakciji kafeinske kiseline u usporedbi s MAE tehnikom. Valja istaknuti i ekstrakcijsku učinkovitost ukupnih polifenola HAE tehnike u slučaju uzoraka D1, D2 i D3 koja nije bila statistički značajno različita ($p > 0,05$) u usporedbi s MAE tehnikom. Ako se ispituje jedna tehnika ekstrakcije, npr. MAE tehnika, kroz sve uzorke, očito je da se polifenolni profil dobričice razlikuje prema prirodnom staništu – u uzorcima D1, D2 i D6 prevladavajući polifenolni spoj bila je klorogenska kiselina (6,10, 7,15 i 4,98 mg g⁻¹ s. tv.), u uzorcima D2 i D7 rutin (8,83 i 3,87 mg g⁻¹ s. tv.), a u uzorcima D3, D4 i D5 ružmarinska kiselina (5,56, 18,69 i 4,14 mg g⁻¹ s. tv.). U istraživanju Varga i suradnika (2016), na udjel polifenolnih spojeva najviše je utjecalo vrijeme sakupljanja dobričice, a manje prirodno stanište, odnosno mjesto sakupljanja. Döring i Petersen (2014) istraživali su polifenolne spojeve u različitim dijelovima dobričice (cvjetovi, listovi, stabljika i korijen). Dobiveni rezultati pokazali su da cvjetovi dobričice sadrže najviši udjel ružmarinske (125,3 mg g⁻¹ s. tv.) i kafeinske (2,1 mg g⁻¹ s. tv.) kiseline, dok su u listovima (8,8 i 0,9 mg g⁻¹ s. tv.), stabljici (6,4 i 0,03 mg g⁻¹ s. tv.) i korijenu (13,1 i 4,0 mg g⁻¹ s. tv.) znatno manje zastupljene. S druge strane, klorogenska kiselina detektirana je u najvišem udjelu u listovima dobričice (20,1 mg g⁻¹ s. tv.), manjem u cvjetovima (15,9 mg g⁻¹ s. tv.), stabljici (13,2 mg g⁻¹ s. tv.) te u najmanjem udjelu u korijenu (0,1 mg g⁻¹ s. tv.) (Döring i Petersen, 2014). Visoki udjel ružmarinske kiseline (3,24 mg g⁻¹ s. tv.) u vodenom ekstraktu dobričice objavili su Belščak-Cvitanović i suradnici (2011), kao i prisutnost kafeinske (0,25 mg g⁻¹ s. tv.) i klorogenske (1,30 mg g⁻¹ s. tv.) kiseline. Ružmarinska kiselina određena je kao najzastupljeniji polifenolni spoj dobričice i u radu Chou i suradnika (2019), u udjelu od 13,98 mg g⁻¹ s. tv., a također je detektirana i klorogenska (2,50 mg g⁻¹ s. tv.), kafeinska (1,82 mg g⁻¹ s. tv.) i ferulinska (0,67 mg g⁻¹ s. tv.) kiselina, dok su, uz rutin (0,94 mg g⁻¹ s. tv.), od flavonoida,



identificirani i genistin (0,90 mg g⁻¹ s. tv.), genistein (0,02 mg g⁻¹ s. tv.) i daidzin (0,14 mg g⁻¹ s. tv.). Grabowska i suradnici (2022) provodili su ekstrakciju polifenolnih spojeva dobričice koristeći refluks, infuziju, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i Soxhlet ekstrakciju. Od fenolnih kiselina u dobivenim ekstraktima identificirane su klorogenska, ružmarinska i protokatehinska kiselina, a od flavonoida rutin i izokvercetin. Najvišu ekstrakcijsku učinkovitost identificiranih polifenolnih spojeva postigli su vodom primjenom ekstrakcije uz refluks – redom 1,32, 3,45, 0,47, 0,99 i 0,96 mg g⁻¹ s. tv. (Grabowska i sur., 2022). Od fenolnih kiselina u dobričici su identificirane i fertarna, neoklorogenska, 2-*O*-kafeoiltreonska, 3-*O*-kafeoiltreonska, 4-*O*-kafeoiltreonska, *p*-kumarilkininska i 1-*O*-kafeoilkininska kiselina, a od flavonoida cirsimaritin i hiperozid (Zorilla i sur., 2023; Sławińska i sur., 2023; Sile i sur., 2022).

U ovome istraživanju, u uzorcima dobričice identificirani su i glikozilirani oblici apigenina i luteolina - apigenin 7-(6'' malonil glikozid) i luteolin 7-*O*-rutinozid s najvećim udjelima u uzorcima D2 (0,90 mg g⁻¹ s. tv.) i D5 (0,68 mg g⁻¹ s. tv.). U istraživanju Sławińska i suradnika (2023) te Sile i suradnika (2022), detektirana je prisutnost apigenina i luteolina u aglikonskom obliku, a i u obliku glikozida - apigenin 7-*O*-glukozid, luteolin 7-*O*-(6'' malonilglukozid), apigenin 7-(6'' malonilglukozid) i luteolin 7-*O*-glukozid. Kikuchi i suradnici (2008) zabilježili su prisutnost apigenina 7-*O*-neohesperidozida, a Yamauchi i suradnici (2007) prisutnost apigenina 7-*O*-β-D-glukopiranozida i luteolina 7-*O*-β-D-glukopiranozida. U dobričici su zabilježeni i glikozilirani oblici kvercetina, krizoeriola i kemferola (Sławińska i sur., 2023; Sile i sur., 2022; Kikuchi i sur., 2008).

5.4. Karakterizacija ekstrakata NIR spektroskopijom

Ekstrakti dobričice analizirani su NIR spektroskopijom u području valnih duljina od 904 do 1699 nm (Slika 30). Apsorpcija u području od 900 do 1000 nm odgovara drugom i trećem overtoneu CH i OH veza te uključuje povezanost s trećim overtoneom CH₃ istežanjem ili s aromatskim skupinama. Apsorpcija u području od 1340 do 1699 nm odgovara prvom i drugom overtoneu CH i drugom overtoneu OH veza te također njihovu povezanost s aromatskim grupama. Navedene veze i skupine očekivane su u polifenolnim spojevima i antioksidansima što ukazuje na njihovu prisutnost u uzorku, a razlike u spektrima upućuju na njihove razlike u sastavu i udjelu (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016). Najznačajnije razlike uočene na NIR spektrima svih ekstrakata nalaze se u području apsorpcije od 1600 do 1699 nm, gdje se posebno ističe krivulja SWE ekstrakata koja ima nižu apsorpciju od HAE i MAE ekstrakata. Također, do



izražaja dolazi odstupanje SWE ekstrakta uzorka D7, koji ima znatno višu apsorpciju od svih preostalih ekstrakata u navedenom području. Ovo područje apsorpcije odgovara prvom overtoneu CH veza povezanih s aromatskim skupinama, što može ukazivati na različiti profil polifenolnih spojeva.

Na NIR spektrima svih ekstrakata određeni su dijelovi spektra koji upućuju na specifične razlike među uzorcima te je stoga napravljena redukcija spektra za daljnju obradu podataka PCA analizom. Za tu analizu (Slika 31) korištene su vrijednosti apsorpcija u rasponu od 904 do 1000 nm i od 1400 do 1699 nm, kako bi se izlučile važne informacije iz dobivenih podataka koje se prikazuju kao nove ortogonalne varijable, odnosno glavne komponente (Saporta i Niang, 2009). Slika 31 prikazuje prva dva faktora PCA analize koji zajedno opisuju 98,16 % podataka (75,70 % faktor 1; 22,46 % faktor 2) pri čemu faktor 1 ima veću značajnost za razlike među uzorcima raspodijeljenih po x-osi. Uzorci su grupirani prema tehnikama ekstrakcije te su HAE i MAE ekstrakti grupirani zajedno, dok su se SWE ekstrakti grupirali zasebno. Rezultati se mogu povezati s rezultatima HPLC analize pojedinačnih polifenolnih spojeva, budući da su u svim ekstraktima pripremljenim HAE i MAE tehnikama isti polifenolni spojevi identificirani i kvantificirani kao dominantni, dok je SWE tehnika rezultirala drugačijim profilom polifenolnih spojeva što je objašnjeno u prethodnom poglavlju (*poglavlje 5.3.*).

5.5. In vitro biološki učinci ekstrakta dobričice

5.5.1. Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta dobričice na kontinuirane humane stanične linije

U ovome radu istraživana je citotoksični, odnosno proliferativni, učinak ekstrakta dobričice na kontinuirane humane stanične linije probavnog sustava jer će tijekom konzumacije ekstrakta, upravo organi tih staničnih linija biti u doticaju s ekstraktom. Tretman od 2 sata izabran je kao maksimalno vrijeme kontakta između ekstrakta i organa probavnog sustava, a tretman od 24 sata izabran je u svrhu uvida u djelovanje ekstrakta na stanične linije tijekom dužeg vremena izlaganja. U ovome istraživanju, korištene su kontinuirane humane stanične linije pločastog epitela karcinoma jezika Cal27, hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2, adenokarcinoma epitela želuca AGS te adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2.

Citotoksično djelovanje ekstrakta dobričice nakon tretmana od 2 sata, uočeno je samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) na HepG2 stanicama i može se povezati s djelovanjem polifenolnih spojeva dobričice, točnije citotoksičnim svojstvima ružmarinske



kiseline, kao najzastupljenijeg polifenolnog spoja dobričice. Naime, u istraživanju Luo i suradnika (2020b) ružmarinska kiselina, u koncentracijskom rasponu 2,5 – 160 μM , inhibirala je proliferaciju humane stanične linije karcinoma usne šupljine SCC-15 indukcijom apoptoze i zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2/M fazi. Isto tako, u istraživanju Chou i suradnika (2020), tretmani ekstraktom dobričice i ružmarinskom kiselinom rezultirali su smanjenjem proliferacije tumorske stanične linije bubrega RCC 786-O, uzrokujući < 50 % preživljenja pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za ekstrakt dobričice, odnosno 200 μM za ružmarinsku kiselinu. Također, u kombiniranom tretmanu s kemoterapeutikom cisplatinom, ekstrakt dobričice i ružmarinska kiselina pojačali su njegov antiproliferativni učinak prema tumorskim stanicama (Chou i sur., 2020). Belščak-Cvitanović i suradnici (2014) detektirali su citotoksično djelovanje vodenog ekstrakta dobričice na staničnoj liniji karcinoma ljudskog grkljana HEP2, izraženijeg kod viših koncentracija, točnije kod koncentracije koja se odnosi na 2,5 puta višu od one u 200 mL vodene infuzije dobričice, i duljem vremenu tretmana od 2 sata. Uzimajući u obzir dobivene rezultate u ovome istraživanju, zaključak je da ekstrakt dobričice tijekom 2 sata tretmana ne uzrokuje neželjene promjene na ispitivanim staničnim linijama probavnog sustava što sugerira njegovu sigurnost prilikom konzumacije u ispitivanom koncentracijskom rasponu.

Kod interpretacije citotoksičnog ili proliferativnog djelovanja ekstrakta dobričice nakon tretmana od 24 sata, važno je uzeti u obzir stabilnost polifenolnih spojeva dobričice. Poznato je da stabilnost različitih bioaktivnih spojeva varira ovisno o uvjetima inkubacije staničnih linija te da tada poluživot polifenola može iznositi manje od 2 sata. U ovome istraživanju, provjerena je stabilnost ružmarinske kiseline u ekstraktu dobričice u uvjetima inkubacije staničnih linija (pH 7,0 – 7,4, 37 °C) te je uočena degradacija od oko 70 % nakon 24 sata (rezultati nisu prikazani). Nestabilnost ružmarinske kiseline u mediju RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*), koji je korišten u ovome istraživanju, dokazana je u radu Long i suradnika (2010) gdje je zabilježena oksidacija ružmarinske kiseline i formiranje vodikovog peroksida proporcionalno povećanju vremena tretmana. Stoga bi citotoksični učinak ekstrakta dobričice na Cal27 stanicama, uočen kod većih koncentracija (0,075 i 0,25 mg mL^{-1}) u usporedbi s nižim (0,0125 i 0,025 mg mL^{-1}), kao i onaj kod HepG2 stanica uočen pri najnižoj koncentraciji ekstrakta (0,0125 mg mL^{-1}), nakon tretmana od 24 sata, bilo pogrešno pripisati djelovanju polifenolnih spojeva dobričice, već je on vrlo vjerojatno rezultat djelovanja produkata oksidacije polifenola i formiranja vodikovog peroksida. Nadalje, uočen oporavak HepG2 stanica nakon 24 sata tretmana, pri koncentracijama od 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL^{-1} , može se povezati s prisustvom enzimskih sustava za detoksifikaciju ksenobiotika i visokim



regeneracijskim kapacitetom staničnih linija. Međutim, Chao i suradnici (2021b) objavili su da etil-acetatna frakcija ekstrakta dobričice nakon 24 sata tretmana HepG2 stanica uzrokuje smanjenje rasta staničnih linija s IC_{50} vrijednošću od $350 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok s druge strane, Grabowska i suradnici (2022) nisu zabilježili značajan utjecaj, bilo vodenog ili etanolnog ekstrakta dobričice, na preživljenje Caco-2 i HepG2 stanica u rasponu koncentracija $10 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ kroz 24 sata.

U skladu s ovim istraživanjem i dostupnom literaturom (Grabowska i sur., 2022; Chao i sur., 2021b; Chou i sur., 2020; Belščak-Cvitanović i sur., 2014), očito je da djelovanje ekstrakta dobričice ovisi o vrsti staničnih linija te da, iako su korištene stanice epitela, ovisno o vrsti organa kojeg prekrivaju, imaju i različite specifične procese koji im omogućuju određenu razinu adaptacije na novonastale uvjete.

5.5.2. Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta dobričice na predstavnike humane mikroflore

Antimikrobna svojstva biljnih ekstrakata sve se više istražuju u području medicine i farmacije, zbog učestalije otpornosti patogenih bakterija na standardne lijekove (Vaou i sur., 2021), ali i u području prehrambene tehnologije kao izvor prirodnih konzervansa (Baenas i sur., 2018). U ovome radu, istraživana je utjecaj ekstrakta dobričice na preživljenje patogenih bakterija *E. coli* i *S. aureus* i na preživljenje probiotičke bakterije *L. plantarum*. Ekstrakt dobričice je u svim ispitivanim koncentracijama ($0,0125 - 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) pokazao bakteriostatsko djelovanje na obje patogene bakterije, dok je probiotičko djelovanje uočeno samo pri koncentraciji ekstrakta od $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$.

Poznato je da polifenolni spojevi pridonose modulaciji sastava crijevne mikrobiote koja dospijeva u debelo crijevo te da ih crijevna mikrobiota može pretvoriti u metabolite s prebiotičkim djelovanjem te da određene doze polifenolnih spojeva mogu inhibirati različite skupine patogenih bakterija s istovremenim razvojem probiotskih mikroorganizama (Holkem i sur., 2022). Polifenolni spojevi u visokim koncentracijama mogu narušiti integritet staničnih membrana i uzrokovati poremećaje u respiratornom lancu elektrona uzrokujući smanjenje ili potpuni izostanak rasta patogenih mikroorganizama. Uz to, uslijed oksidacije polifenola nastaje vodikov peroksid koji inducira nastajanje lomova u DNK što za posljedicu ima baktericidno djelovanje (Piekarska-Radzik i Klewicka, 2020). Citotoksični učinak ekstrakta dobričice prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus* može se povezati s dokazanim antimikrobnim svojstvima ružmarinske kiseline. U istraživanju Abedini i suradnika (2013), ružmarinska kiselina i metil ružmarinat smatrani su glavnim antimikrobnim spojevima vodeno-metanolnog ekstrakta biljke



Hyptis atrorubens, koji je inhibirao rast 29 od 46 mikroorganizama, među kojima i *S. aureus*. Alagawany i suradnici (2017) objavili su da ekstrakt ružmarina, koji obiluje ružmarinskom kiselinom, pokazuje izraženo antibakterijsko djelovanje na Gram pozitivne bakterije, dok je kod Gram negativnih bakterija, uključujući *E. coli* i *S. typhimurium*, taj učinak izostao. U istome istraživanju autori (Alagawany i sur., 2017) su naveli da metanolni ekstrakt ružmarina koji sadrži 30 % karnozne kiseline, 16 % karnosola i 5 % ružmarinske kiseline djeluje kao učinkovitiji antimikrobni agens na širi spektar mikroorganizama, u usporedbi s vodenim ekstraktom ružmarina koji sadrži 15 % ružmarinske kiseline, iz čega se može zaključiti da se antimikrobni učinak ružmarinske kiseline pojačava u sinergiji s mehanizmima djelovanja drugih bioaktivnih spojeva te varira ovisno o prisustvu drugih spojeva. U istraživanju Kumarasamy i suradnika (2002), metanolni ekstrakt dobričice pokazao je inhibitorni učinak na 14 bakterijskih vrsta, među kojima i na *E. coli* i *S. aureus* s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 5,00 i 0,25 mg mL⁻¹, dok je u istraživanju Coss i suradnika (2018), vodenometanolni ekstrakt dobričice pokazao vrlo nisku antimikrobnu aktivnost prema *E. coli* i *S. aureus*. Isti autori (Coss i sur., 2018) navode da to ne znači nužno da dobričica ne sadrži značajan udjel bioaktivnih spojeva odgovornih za antimikrobno djelovanje te da ekstrakt dobričice može djelovati na neizravan način, odnosno da može sadržavati prekursorske spojeve koji zahtijevaju bioaktivaciju u tijelu. Gwiazdowska i suradnici (2022) istraživali su antimikrobno djelovanje ekstrakta dobričice pripremljenog superkritičnim CO₂ te su odredili najjače antimikrobno djelovanje na *S. aureus* s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 0,3 mg mL⁻¹, a također su detektirali veću osjetljivost Gram pozitivnih bakterija u odnosu na Gram negativne bakterije. S druge strane, stimulativni učinak ekstrakta dobričice, uočen pri koncentraciji 0,075 mg mL⁻¹, na rast bakterije *L. plantarum* može se povezati s utjecajem polifenolnih spojeva u poboljšanju funkcija crijevne mikrobiote jer probiotičke bakterije imaju sposobnost metaboliziranja polifenolnih spojeva (Alagawany i sur., 2017). Također, prebiotičko djelovanje ekstrakta dobričice može se djelomično povezati s prisutnošću topljivih prehrambenih vlakana u uzorku dobričice koji su tijekom ekstrakcije prešli u ekstrakt (Tablica 18, poglavlje 4.1.).

Rezultati istraživanja ukazali su da ekstrakt dobričice posjeduje iznimno antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama *E. coli* i *S. aureus*, ukazujući na potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervans, dok se prebiotička primjena pokazala upitnom, no, potrebna su daljnja istraživanja u tom smjeru.



5.5.3. Antioksidacijski i prooksidacijski učinak ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama

Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species* - ROS) predstavljaju radikale kisika i njegove reaktivne neradikalne derivate koji se lako mogu konvertirati u radikale. Radikali su općenito manje stabilni nego neradikalni derivati, ali njihova reaktivnost je značajno viša (Pham-Huy i sur., 2008). Formiranje ROS-ova događa se tijekom normalnog funkcioniranja metabolizma te su oni uključeni u mnoge enzimске reakcije, mitohondrijski prijenos elektrona, prijenos signala, aktivaciju nuklearnog transkripcijskog faktora, ekspresiju gena i antimikrobnu aktivaciju neutrofila i makrofaga (Bayir, 2005). ROS-ovi su u malim i umjerenim koncentracijama ključni za normalno funkcioniranje organizma, dok u slučaju visokih koncentracija uzrokuju pojavu oksidacijskog stresa (Jamshidi-Kia i sur., 2020; Pham-Huy i sur., 2008). Organizam ima dva mehanizama za suzbijanje oksidacijskog stresa - stvaranjem antioksidansa *in situ* (endogeni antioksidansi) ili unosom antioksidansa kroz hranu (egzogeni antioksidansi). Polifenolni spojevi pripadaju skupini egzogenih antioksidansa, a mehanizmi njihovog antioksidacijskog djelovanja uključuju izravno uklanjanje reaktivnih slobodnih radikala, keliranje tragova metalnih iona, inhibiciju enzima uključenih u stvaranje slobodnih radikala, indukciju antioksidacijskih enzima i regeneraciju membranski vezanih antioksidansa (Du i sur., 2007; Liu i Guo, 2005). Antioksidacijski kapacitet polifenolnih spojeva ovisi o broju, ali i položaju hidroksilnih skupina u molekularnoj strukturi. Na primjer, veća udaljenost između karboksilne skupine i aromatskog prstena kod fenolnih kiselina utječe povoljno na antioksidacijski kapacitet. Iz tog razloga hidroksicimetične kiseline i njeni derivati su snažniji antioksidansi od hidroksibenzojevičkih kiselina i njenih derivata. Hidroksilne skupine na aromatskom prstenu na *orto*- i/ili *para*-položaju mogu dovesti do snažnije antioksidacijske aktivnosti u usporedbi s drugim položajima i nesupstituiranim benzenskim prstenom. Također, veći broj aromatskih prstenova s vezanim hidroksilnim skupinama u strukturi, kao što je to slučaj kod flavonoida, povezan je s većim antioksidacijskim kapacitetom. Naročito važnima u sposobnosti keliranja metala i neutralizacije slobodnih radikala kod flavonoida su prisutnost *o*-dihidroksilne (kateholne) strukture u B-prstenu, 2,3-dvostruke veze u konjugaciji s 4-keto-skupinom te prisutnost hidroksilnih skupina na 3- i 5-položaju (3-OH i 5-OH) (Zhang i Tsao, 2016).

U svrhu *in vitro* ispitivanja antioksidacijskog djelovanja ekstrakta dobričice, korištene su iste stanične linije kao i u ispitivanju citotoksičnog djelovanja ekstrakta, odnosno kontinuirane humane stanične linije pločastog epitela karcinoma jezika Cal27, hepatocelularnog karcinoma



jetre HepG2, adenokarcinoma epitela želuca AGS te adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2. Prema dobivenim rezultatima, *in vitro* antioksidacijsko djelovanje ekstrakta dobričice značajno ovisi o vrsti stanične linije na kojoj se ispituje. Tretman ekstraktom dobričice tijekom 2 sata uzrokovao je prooksidacijsko djelovanje pri višim koncentracijama na HepG2 stanicama, točnije pri koncentracijama od 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹, zatim na AGS stanicama pri 0,075 mg mL⁻¹, te u konačnici i na Caco-2 stanicama pri 0,025 i 0,075 mg mL⁻¹. Preživljenje ovih staničnih linija u istim uvjetima tretmana (*poglavlje 5.5.1.*) nije bilo statistički značajno promijenjeno ($p > 0,05$), izuzev HepG2 stanica pri koncentraciji od 0,25 mg mL⁻¹ gdje je uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje preživljenja, što dokazuje da ROS-ovi nisu uzrokovali oštećenja stanične strukture, već su indukcijom oksidacijskog stresa potaknuli antioksidacijski obrambeni sustav staničnih linija. Važnu ulogu u održavanju staničnog redoks stanja ima glutation, a iako točan mehanizam nije razjašnjen, smatra se da ROS-ovi nastali autooksidacijom polifenola, smanjuju razinu glutaciona koji se troši za suzbijanje oksidacijskog stresa, što je signal stanici za aktivaciju transkripcije gena koji kodiraju za γ -glutamilstein sintetazu, enzima koji ograničava brzinu sinteze glutaciona (Babich i sur., 2011). U spomenutom slučaju HepG2 stanica, moguće je da su slobodni radikali, točnije ROS-ovi, nastali autooksidacijom polifenolnih spojeva dobričice u alkalnom mediju, rezultirali oštećenjem stanične strukture i tako smanjili preživljenja stanica.

Nakon tretmana od 24 sata na Cal27 staničnoj liniji, više koncentracije ekstrakta dobričice pokazale su prooksidacijsko djelovanje, a niže koncentracije antioksidacijsko djelovanje, što je u direktnoj vezi s preživljenjem iste stanične linije u istim uvjetima tretmana (*poglavlje 5.5.1.*), odnosno veće preživljenje stanica uočeno je kod većeg antioksidacijskog djelovanja ekstrakta dobričice. Na HepG2, AGS i Caco-2 stanicama, ekstrakt dobričice je pri većim koncentracijama (0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) tijekom 24 sata pokazao snažnije antioksidacijsko djelovanje u odnosu na kraće vrijeme tretmana od 2 sata. Moguće da su ROS-ovi, nastali autooksidacijom polifenolnih spojeva iz ekstrakta dobričice, inducirali blagi oksidacijski stres koji je posljedično rezultirao aktivacijom antioksidacijskih sustava što se očituje u smanjenju razine ROS-ova nakon tretmana od 24 sata, proporcionalno povećanju koncentracije ekstrakta.

5.5.4. Antioksidacijski i prooksidacijski učinak ekstrakta dobričice na modelnoj DNK

Deoksiribonukleinska kiselina (DNK) je najčešće dvolančana molekula koja u normalnim staničnim uvjetima ne sadrži lomove i strukturne promjene. Promjene u strukturi DNK rezultiraju znatno većim posljedicama u usporedbi s promjenama na proteinima, lipidima ili RNK jer DNK predstavlja jedinstvenu kopiju genoma stanice i nastala oštećenja mogu



zaustaviti replikaciju i transkripciju te rezultirati češćom pojavom mutacija (Lindahl, 1993). U ovome radu, istraživana je utjecaj ekstrakta dobričice na oksidacijska oštećenja modelne DNK (plazmid phiX174 RF1 DNA), izazvana djelovanjem hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$) koji nastaje uslijed izlaganja vodikovog peroksida (H_2O_2) UV zračenju. Hidroksil radikal je visoko reaktivni radikal koji može uzrokovati razmatanje superzavijene plazmidne strukture te se u ovome istraživanju pratilo očuvanje superzavijenog oblika plazmida. Nadalje, nastali hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) reagira izravno sa svim komponentama DNK, odnosno s purinskim i pirimidinskim bazama i okosnicom šećera deoksiriboze, uzrokujući jednolančane i dvočlančane lomove (Dizdaroglu i Jaruga, 2012; Halliwell i Gutteridge, 2007). Hidroksil radikal apstrahira vodikove atome modificirajući purin, stvarajući derivate pirimidina i umrežavanje proteina DNK (Dizdaroglu i Jaruga, 2012). Oksidira gvanozin i timin u 8-hidroksi-2-deoksigvanozin i timin glikol što dovodi do modifikacije DNK, mutogeneze i karcinogeneze (Kasai, 1997).

Rezultati istraživanja pokazali su da ekstrakt dobričice u svim ispitivanim koncentracijama ($0,0125 - 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) posjeduje iznimno antioksidacijsko djelovanje, odnosno da ima izraženo protektivno djelovanje na oksidacijska oštećenja modelne DNK, u usporedbi s pozitivnom kontrolom. U pozitivnoj kontroli, djelovanje UV zračenja i H_2O_2 , rezultiralo je smanjenjem udjela superzavijenog oblika plazmida na 77,49 %, dok je u prisutnosti ekstrakta dobričice udjel sačuvanog superzavijenog oblika plazmida bio viši, a kod najviše ispitivane koncentracije ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) ekstrakta iznosio je čak 95,89 %. Oalđe i suradnici (2021) proučavali su učinak metanalnog, etanalnog i vodenog ekstrakta dobričice na zaštitu plazmida pUC19 od hidroksilnih radikala. Utvrdili su koncentracijski ovisno genoprotektivno djelovanje ekstrakta protiv hidroksilnih radikala pri čemu je vodeni ekstrakt u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} pružio najveću zaštitu DNK s oko 10 % relaksiranog oblika plazmidne DNK. Za usporedbu, za pozitivnu kontrolu (plazmid tretiran UV zračenjem bez testiranja s ekstraktom) zabilježeno je oko 75 % relaksiranog oblika plazmidne DNK. Također, isti autori naveli su da snažna genoprotektivna aktivnost ekstrakta dobričice nije rezultat isključivo polifenolnih spojeva, već i drugih spojeva, poput ugljikohidrata i terpena, koji se također nalaze u vodenim ekstraktima (Oalđe i sur., 2021).

5.5.5. Genotoksični i genoprotektivni učinak ekstrakta dobričice na kontinuiranim humanim staničnim linijama

In vitro ispitivanje učinka ekstrakta dobričice na oksidacijska oštećenja DNK humanih staničnih linija probavnog sustava (Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 stanice) pokazalo je da ekstrakt dobričice u određenim koncentracijama može iskazati genotoksično djelovanje, što je



uočeno kod CaL27 stanica povećanjem intenziteta repa i repnog momenta u odnosu na kontrolu, pri koncentraciji od $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$, i kod HepG2 stanica pri koncentracijama od $0,0125$ i $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$. Međutim, statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) intenziteta repa i repnog momenta s povećanjem vremena tretmana od 2 na 24 sata uočeno kod Cal27, HepG2, AGS i Caco-2 stanica, redom kod koncentracija od $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$, može značiti da, iako bioaktivni spojevi dobričice mogu u kraćem vremenu od 2 sata izazvati genotoksično djelovanje, kroz duže vrijeme sudjeluju u popravku DNK.

Chao i suradnici (2021a) objavili su rezultate koji ukazuju na protektivan učinak vodenog ekstrakta dobričice, u rasponu koncentracija $12,5 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$, na oksidacijska oštećenja DNK PC12 stanica feokromocitoma izazvanih pomoću H_2O_2 u vidu značajnog smanjenja fragmentacije DNK. Zaštitni učinak ekstrakta dobričice u koncentraciji od $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ na oksidacijska oštećenja DNK objavljen je i u radu Sławińska i suradnika (2023) na modelu PBM stanica (mononuklearne stanice periferne krvi). Navedena djelovanja ekstrakta dobričice također se u velikoj mjeri opet pripisuju ružmarinskoj kiselini. *In vitro* ispitivanjem genoprotektivnog učinka polifenolnih spojeva na modelu stanica mišjih neurona, Silva i suradnici (2008) pokazali su da ružmarinska kiselina sudjeluje u popravku oksidiranih baza, kao i lomova u DNK, te da na taj način štiti genetički materijal od oksidacijskih oštećenja. Vostálová i suradnici (2009) objavili su da ružmarinska kiselina smanjuje UVB-inducirane promjene na staničnoj liniji humanih keratinocita HaCaT smanjenjem lomova DNK i razine ROS-ova.

5.5.6. Antioksidacijski i prooksidacijski učinak ekstrakta dobričice na albuminu iz goveđeg seruma

ROS-ovi mogu promijeniti sastav i strukturu proteina pri čemu dolazi do formiranja karbonila i drugih derivata aminokiselina. Dostupnost kisika, superoksida ($\text{O}^{\cdot-}$) i hidroksiperoksila (HO_2^{\cdot}) određuje tijek oksidacije proteina. Formiranje 3-klorotirozina iz tirozina pomoću hipokloraste kiseline (HOCl), oksidacija histidina u 2-oksohistidin na mjestu vezanja metala na proteinima, oksidacija tiolne grupe i proizvodnja karbonilnih derivata aminokiselina su neki od primjera modifikacije proteina. ROS-ovi također mogu uzrokovati oksidacijska oštećenja na aminokiselinskim ostacima lizina, prolina, arginina te treonina. Oksidacijska oštećenja aminokiselina uzrokuju denaturaciju proteina te gubitak funkcije, bilo da se radi o enzimskoj aktivnosti, funkciji receptora ili funkciji transporta. Karbonilne skupine na proteinima smatraju se biomarkerima oksidacije proteina uzrokovane djelovanjem slobodnih radikala (Martemucci i sur., 2022).



U ovome istraživanju, ekstrakt dobričice u najvišoj ispitivanoj koncentraciji ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) pokazao je značajnu zaštitu modelnog proteina od oksidacijskih oštećenja, izraženiju čak i od Trolox-a. Sławińska i suradnici (2023) tretirali su ljudsku plazmu s $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ i objavili značajno smanjenje koncentracije karboniliranih proteina uslijed djelovanja ekstrakta dobričice u koncentraciji od $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta dobričice je, između ostalog, vezano uz prisustvo polifenolnih spojeva. U prilog tome idu i rezultati istraživanja Ou i suradnika (2017) koji su odredili inhibitorno djelovanje ružmarinske kiseline u nastajanju proteinskih karbonila na modelu BSA proteina s porastom koncentracije ($6,25 - 400 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).

5.6. *In vivo* biološki učinci ekstrakta dobričice

5.6.1. Udjel organa u masi štakora

Eksperimentalne životinje, točnije Sprague Dawley štakori, testnih skupina i kontrole su vagane na prvi dan početka eksperimenta i na dan žrtvovanja te je određena promjena mase kroz tretman (rezultati nisu prikazani). Nije uočena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u promjeni mase između testnih skupina i kontrole, neovisno o spolu, te je detektirano izuzetno malo povećanje mase u rasponu $1,5 - 3,0 \%$. Smatra se da je, uz promjenu tjelesne mase, i promjena mase unutarnjih organa eksperimentalnih životinja dobar pokazatelj toksičnosti. U istraživanju su, nakon žrtvovanja, provedene analize na bubrezima, slezeni i jetri. Udjeli organa u masi štakora nisu se razlikovali ovisno o spolu i iznosili su za bubreg oko $0,6 \%$, za slezenu oko $0,2 \%$ te za jetru oko $3,0 \%$. Odeh i suradnici (2022) objavili su vrlo slične vrijednosti za udjel istih organa u masi Y59 štakora. Piao i suradnici (2013) određivali su mase različitih organa Sprague Dawley štakora različite starosti, te su za muške štakore, starosti 52 tjedna, koji su slične starosti kao i štakori u ovome istraživanju, odredili udjel bubrega od $0,65 \%$, slezene od $0,16 \%$ i jetre od $2,15 \%$, a za ženske štakore iste starosti udjele od $0,79$, $0,20$ i $2,5 \%$, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Mase jetre i bubrega smatrane su korisnima u studijama toksičnosti zbog njihove osjetljivosti za predviđanje toksičnosti i dobre korelacije s histopatološkim promjenama (Amna i sur., 2013). U ovome istraživanju nije uočena statistički ($p > 0,05$) značajna promjena u udjelu jetre između testnih i kontrolnih skupina štakora, dok više koncentracije (500 i 1000 mg kg^{-1}), koje su pokazale značajan utjecaj na promjenu udjela bubrega i slezene u odnosu na kontrolu, nisu bile statistički značajno ($p > 0,05$) različite u odnosu na nižu koncentraciju (250 mg kg^{-1}). Stoga, tretman ekstraktom dobričice nije pokazao toksični učinak na organe uzimajući u obzir rezultate promjene udjela organa na masu štakora.



5.6.2. Utjecaj ekstrakta dobričice na biokemijske i hematološke parametre krvi štakora

Analiza krvi štakora provedena je u svrhu uvida u mogućnost pojave upalnih procesa, nekih bolesti, anemije ili infekcije kod eksperimentalnih životinja uslijed tretmana ekstraktom dobričice. Od biokemijskih parametara krvi određeni su udjel proteina, aktivnost jetrenih enzima (ALT i AST) i laktat-dehidrogenaze, udjel glukoze, ukupnog bilirubina, ureje i kreatinina. Iako su kod nekih testnih skupina štakora uočene značajne razlike u udjelu proteina u odnosu na kontrolnu skupinu, vrijednosti se i dalje nalaze unutar očekivanih vrijednosti za krv zdravih Sprague Dawley štakora (Zaias i sur., 2009). Povećana aktivnost jetrenih enzima, uočena kod ženskih štakora, može biti povezana s pojavom upale ili oštećenja stanica u jetri, ali za takav zaključak potrebne su detaljnije analize jetre i njezinih funkcija. Također, pošto u jetri dolazi do metabolizma biološki aktivnih spojeva, moguće da nastali metaboliti uzrokuju rast aktivnosti jetrenih enzima. Nasuprot tome, rezultati analize bilirubina, koji je glavni produkt raspada crvenih krvnih stanica i kojeg razgrađuje jetra, nije ukazao na promjenu funkcije jetre uslijed tretmana ekstraktom dobričice, neovisno o koncentraciji. Aktivnost laktat-dehidrogenaze i udjel glukoze nisu bili statistički značajno različiti ($p > 0,05$) između testnih i kontrolnih skupina na temelju čega se može zaključiti da tretman ekstraktom dobričice nije uzrokovao oštećenja tkiva i nije utjecao na metabolizam ugljikohidrata. Urea i kreatinin smatraju se markerima bubrežne funkcije i prema dobivenim rezultatima vidljivo je da su bubrezi štakora normalno funkcionirali, jedino je kod ženskih štakora uočeno značajno povećanje ureje u krvi uslijed tretmana ekstraktom od 500 i 1000 mg kg⁻¹. Kemijska analiza dobričice (poglavlje 4.1.) pokazala je da značajan udjel suhe tvari čine proteini (15,61 % s. tv.) koji zasigurno određenim dijelom prijeđu u ekstrakt tijekom ekstrakcije i moguće je da su oni utjecali na povećanje koncentracije ureje u krvi ženskih štakora (Martin i sur., 2005). S obzirom da nisu uočene razlike između testnih i kontrolnih skupina u udjelu kreatinina, može se zaključiti da tretman ekstraktom dobričice nije utjecao na brzinu glomerularne filtracije (Ghalehkandi i sur., 2012).

Uz biokemijske parametre krvi, određena je kompletna krvna slika, koja je uključivala broj leukocita, eritrocita i trombocita, eritrocitne konstante (MCV, MCH, MCHC i RDW), trombocitnu konstantu (MPV), hemoglobin i hematokrit, te diferencijalna krvna slika, uključujući podvrste leukocita – neutrofilne granulocite, limfocite, monocite, eozinofilne granulocite i bazofilne granulocite. Povećanje broja leukocita u krvi muških štakora testnih skupina može ukazati na pojavu infekcije ili upalnog procesa, praćeno također i povećanjem udjela limfocita. Unatoč određenim razlikama između testnih i kontrolnih skupina štakora,



diferencijalna krvna slika, odnosno udjel neutrofilnih granulocita, limfocita, monocita, eozinofilnih granulocita i bazofilnih granulocita, u skladu je s očekivanim vrijednosti za krv zdravih Sprague-Dawley štakora (Delwatta i sur., 2018), kao i broj eritrocita i vrijednosti eritrocitnih konstanta (Taib i sur., 2009). Udjel trombocita nije bio statistički značajno promijenjen ($p>0,05$) uslijed tretmana ekstraktom dobričice što ukazuje na činjenicu da ekstrakt nije utjecao na funkcije koagulacije i hemostaze (Yan i sur., 2023).

5.6.3. Utjecaj ekstrakta dobričice na koncentraciju karboniliranih proteina bubrega, slezene i jetre

Karbonilacija proteina najčešća je vrsta nepovratne modifikacije proteina izazvana djelovanjem ROS-ova koja uzrokuje različite strukturne i funkcionalne promjene na proteinima (Catalán i sur., 2018). Polifenolni spojevi sudjeluju u zaštiti proteina od oksidacije neutralizacijom hidroksilnih radikala stvaranjem fenoksilnih radikala autooksidacijom, a također i kao kelatori metalnih iona pri čemu sprečavaju stvaranje karbonila i oksidacijskih modifikacija grupa bočnih lanaca aminokiselina induciranim željeznim ionima (Pan i sur., 2020; Stadtman, 2006).

U ovome istraživanju, kod ženskih štakora ni jedna od ispitivanih koncentracija ekstrakta dobričice nije pokazala pozitivan učinak na intenzitet karbonilacije proteina u vidu njegovog smanjenja u ispitivanim organima, a u bubrezima i slezeni uočeno je i povećanje kod koncentracija ekstrakta od 500 i 250 mg kg⁻¹. Što se tiče muških štakora, pokazalo se da različite koncentracije ekstrakta rezultiraju različitim učincima ovisno o organima. Tako je koncentracija ekstrakta od 1000 mg kg⁻¹ uzrokovala statistički značajno ($p<0,05$) povećanje koncentracije karboniliranih proteina u bubrezima i istovremeno statistički značajno ($p<0,05$) smanjenje istih u jetri. Koncentracija ekstrakta od 250 mg kg⁻¹ mogla bi se smatrati najpoželjnijom s obzirom na pozitivan učinak na slezeni muških štakora, a bez značajnog utjecaja na karbonilaciju proteina bubrega i jetre. U slučaju ženskih štakora, bilo bi dobro ponoviti eksperiment s nižim koncentracijama ekstrakta dobričice što bi moglo rezultirati smanjenjem koncentracije karboniliranih proteina u bubrezima, jetri i slezeni, ali trebaju se uzeti u obzir i drugi parametri oksidacijskog stresa koji su objašnjeni u nastavku. Polifenolni spojevi poznati su po snažnom antioksidacijskom djelovanju, a isto tako poznato je da, ovisno o pH, mjestu djelovanja, sposobnosti keliranja, potencijalu redukcije metala i svojstvima topljivosti, mogu djelovati i prooksidacijski (Rudrapal i sur., 2022), što može objasniti povećanje intenziteta karbonilacije proteina bubrega muških štakora pri koncentraciji ekstrakta od 1000 mg kg⁻¹ i ženskih pri 500 mg kg⁻¹, kao i slezene ženskih štakora pri koncentraciji ekstrakta od 250 mg kg⁻¹. Suprotno tome, Farr i suradnici (2016) objavili su da je tretman



miševa ružmarinskom kiselinom, koja je najzastupljeniji polifenolni spoj dobričice, u koncentracijama od 1,6, 16 i 32 mg kg⁻¹ rezultirao smanjenjem proteinskih karbonila u hipokampusu. Rutin, flavonoid također prisutan u ekstraktu dobričice, je u istraživanju Funabiki i suradnika (1999), u obliku derivata 4^G-R-glukopiranozilrutin, doziran štakorima inkorporacijom u hranu (2,5 %) kroz 18 dana što je rezultiralo smanjenjem koncentracije karboniliranih proteina u jetri.

5.6.4. Utjecaj ekstrakta dobričice na intenzitet peroksidacije lipida bubrega, slezene i jetre

Lipidna peroksidacija događa se u svim aerobnim stanicama i pretpostavlja se da uključuje 1 % kisika stanica, organa i tijela, a ciljani spojevi su polinezasićene masne kiseline i fosfolipidi. Slobodne masne kiseline posjeduju karbonilnu grupu (C=O) oskudnu u elektronima, dok su u polinezasićenim masnim kiselinama oskudne u elektronima veze ugljik-ugljik (C=C), što ih oboje čini podložnima djelovanju raznih oksidacijskih spojeva. Također, uspoređujući fosfolipide i trigliceride, fosfolipidi u svojoj strukturi sadrže znatno više nezasićenih masnih kiselina, odnosno sadrže više nezasićenih C=C veza, što ih čini podložnijima oksidaciji (Martemucci i sur., 2022). Lipidi su glavna komponenta staničnih membrana i sadrže neke od ključnih enzima te reguliraju različite biološke procese u stanici. Povećana koncentracija produkata lipidne peroksidacije uzrokuje promjene u strukturnoj organizaciji i funkcijama stanične membrane uključujući smanjenu fluidnost i povećanu propusnost membrane, inaktivaciju enzima vezanih na membranu i gubitak esencijalnih masnih kiselina (Singh i sur., 2017).

U ovome istraživanju, ni jedna od ispitivanih koncentracija ekstrakta dobričice nije rezultirala nepoželjnim učinkom, odnosno povećanjem intenziteta peroksidacije lipida tkiva ispitivanih organa, nego je detektiran antioksidacijski učinak pri određenim koncentracijama, ovisno o organu, što se velikim dijelom može pripisati prisustvu polifenolnih spojeva u ekstraktu dobričice, naročito ružmarinskoj kiselini, kao dominantnom polifenolnom spoju. Chung i suradnici (2020) nisu zabilježili značajan utjecaj ekstrakta dobričice na intenzitet peroksidacije lipida jetre miševa tijekom 28 dana u koncentracijama ekstrakta od 0,25, 0,50 i 1,00 g kg⁻¹. Oteiza i suradnici (2005) navode da je sposobnost polifenolnih spojeva da prodru u lipidne dvoslojeve nedvojbeno ključna za zaštitu od njihove peroksidacije te da na taj način polifenoli mogu inhibirati širenje lipidne oksidacije pomoću dva mehanizma - presretanjem intramembranskih radikala i/ili povećanjem fluidnosti membrane, što dezorganizira lipidne lance i sprječava širenje radikala. Fadel i suradnici (2011) objavili su da se ružmarinska kiselina spontano umeće u membranu 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfokolina, koji je istraživan kao



model lipida, do 1 mol% što je dovoljno visoko da u potpunosti spriječi peroksidaciju lipida bez ikakve značajne promjene u strukturi membrane. Isti autori (Fadel i sur., 2011) navode da bi ružmarinska kiselina mogla učinkovito zaštititi plazma membrane stanica sisavaca od oksidacije lipida, ali manje kod dijelova s većim udjelom kolesterola jer on usporava penetraciju ružmarinske kiseline. U radu Lin i suradnika (2017), korištenjem modela štakora s induciranom ekstrahepatičnom kolestazom, dnevna primjena ružmarinske kiseline u koncentraciji od 5 i 20 mg kg⁻¹ kroz 4 tjedna, između ostalog, pokazala je i značajan utjecaj na smanjenje intenziteta peroksidacije lipida jetre. Isti autori (Lin i sur., 2017) naveli su da, pošto oksidacijski stres ima patogenu ulogu u kolestatskoj bolesti jetre putem modulacije ekspresije gena i aktivnosti stanica koje uključuju mehanizam NF-kB i AP-1, rješavanje oksidacijskog opterećenja može biti metoda kojom ružmarinska kiselina potiskuje redoks-osjetljivo NF-kB i AP-1 djelovanje, posljedično dovodeći do hepatoprotektivnog učinka. Chen i suradnici (2015) objavili su značajno smanjenje intenziteta peroksidacije lipida jetre i bubrega miševa (starosti 6 tjedana), u odnosu na kontrolu koja je sadržavala starije miševe (starosti 20 mjeseci), kao posljedicu tretmana ružmarinskom kiselinom u koncentraciji od 200 mg kg⁻¹ kroz 30 dana. Mehanizam kojim ružmarinska kiselina ispoljava antioksidacijsko djelovanje posljedica je prisustva dviju struktura katehola konjugiranih sa skupinom karboksilne kiseline (del Baño i sur., 2003). Od polifenolnih spojeva prisutnih u dobričici, klorogenska i kafeinska kiselina, te rutin također su poznati kao snažni antioksidansi. Klorogenska kiselina, je u istraživanju Ali i suradnika (2017) rezultirala smanjenjem intenziteta peroksidacije lipida jetre štakora (kod kojih je oksidacijski stres bio izazvan pomoću metotreksata) nakon tretmana kroz 20 dana u koncentracijama od 50 i 100 mg kg⁻¹, kao i kafeinska kiselina, u istraživanju Jayanthi i Subash (2010), smanjenjem peroksidacije lipida plazme i jetre štakora (kod kojih je oksidacijski stres bio izazvan pomoću oksitetraciklina) nakon tretmana kroz 15 dana u koncentraciji od 40 mg kg⁻¹. Isto tako, u istraživanju Karthich i Prince (2006), tretman štakora (kod kojih je infarkt miokarda bio izazvan izoproterenolom) rutinom u koncentracijama od 40 i 80 mg kg⁻¹ kroz 42 dana uzrokovao je smanjenje intenziteta peroksidacije lipida seruma i srca.

5.6.5. Utjecaj ekstrakta dobričice na koncentraciju ukupnog glutationa bubrega, slezene i jetre

Glutation je tripeptid sastavljen od glicina, cisteina i glutamata koji se nalazi u većini stanica i najviše utječe na redoks stanje stanica. Kao endogeni antioksidans odgovoran je za neutralizaciju slobodnih radikala i peroksida, nastalih tijekom normalnog odvijanja metabolizma, koji u protivnom mogu dovesti do oksidacijskih oštećenja proteina, lipida i



nukleinskih kiselina. U stanicama je prisutan u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) obliku. Polifenolni spojevi, naročito flavonoidi, moduliraju ekspresiju enzima γ -glutamilcistein sintetaze koji ograničava brzinu sinteze glutaciona. U *in vitro* uvjetima polifenolni spojevi povećavaju ekspresiju γ -glutamilcistein sintetaze, a isto je dokazano i u *in vivo* uvjetima praćeno povećanjem intracelularnih koncentracija glutaciona u mišićima miševa (Moskaug i sur., 2005).

U ovome istraživanju, ekstrakt dobričice, neovisno o koncentraciji, nije rezultirao povećanjem ukupnog glutaciona ni u jednom ispitivanom organu, dok je koncentracija od 250 mg kg⁻¹ uzrokovala statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje ukupnog glutaciona u slezeni ženskih štakora, kao i koncentracija od 500 mg kg⁻¹ u bubrezima i slezeni muških štakora i u jetri ženskih štakora, te u konačnici i koncentracija od 1000 mg kg⁻¹ u slezeni muških i ženskih štakora i u jetri ženskih štakora. Smanjenje koncentracije ukupnog glutaciona može ukazati na prooksidacijsko djelovanje ekstrakta dobričice pošto se glutacion „troši“ za suzbijanje oksidacijskog stresa.

Ružmarinska kiselina, najzastupljeniji spoj u ekstraktu dobričice, također može utjecati na regulaciju enzima γ -glutamilcistein sintetaze. U radu Lu i suradnika (2017), ružmarinska kiselina stimulirala je aktivnost promotora ARE (engl. *antioxidant response element*) induciranjem translokacije Nrf2, čimbenika transkripcije potrebnog za aktiviranje enzima faze II, kao odgovor stanice na oksidacijski stres, u jezgru i naknadnom regulacijom enzima γ -glutamilcistein sintetaze što je rezultiralo povećanjem udjela GSH i time smanjenjem razine ROS-ova. Ipak, polifenolni spojevi, naročito flavonoidi, u višim koncentracijama podliježu autooksidaciji pri čemu nastaju elektrofilni metaboliti kinonskog tipa koji tvore konjugate s GSH ili semikinon radikali koji, u svrhu regeneriranja, ulaze u reakciju s GSH, što rezultira smanjenjem koncentracije ukupnog glutaciona (Galati i sur., 1999) i moguće je objašnjenje za smanjenje koncentracije ukupnog glutaciona uslijed tretmana ekstraktom dobričice u ovome istraživanju.

Xiao i suradnici (2021) objavili su da Hitrechol[®], komercijalni proizvod koji sadrži ekstrakt dobričice, a namijenjen je za otapanje žučnih kamenaca, nije značajno utjecao na koncentraciju glutaciona u jetri miševa u kombinaciji s normalnom prehranom, nakon tretmana od 3 tjedna. U radu Bacanlı i suradnika (2015), tretman štakora, s induciranom sepsom, ružmarinskom kiselinom u koncentraciji od 100 mg kg⁻¹ uzrokovao je značajno povećanje koncentracije glutaciona u bubrezima, u odnosu na kontrolu s induciranom sepsom. Isti autori (Bacanlı i sur., 2015), naveli su da se koncentracija glutaciona u bubrezima nije razlikovala između skupine



tretirane ružmarinskom kiselinom i „sham“ skupine. Slični rezultati zabilježeni su i za klorogensku kiselinu, u istraživanju Ali i suradnika (2017), koja je u koncentraciji od 100 mg kg⁻¹ nakon 20 dana uzrokovala povećanje koncentracije glutaciona u jetri štakora, kod kojih je oksidacijski stres bio izazvan djelovanjem metotreksata. Isto tako, kafeinska kiselina je u istraživanju Pari i Prasath (2008), u koncentraciji od 60 mg kg⁻¹ kroz 20 dana rezultirala povećanjem koncentracije glutaciona u jetri štakora, kod kojih je oksidacijski stres bio izazvan pomoću nikla.

5.6.6. Utjecaj ekstrakta dobričice na aktivnost superoksid dismutaze bubrega, slezene i jetre

Superoksid dismutaza nalazi se u svim živim organizmima i čini prvu liniju obrane od oksidacijskih oštećenja posredovanih ROS-ovima. Ovaj enzim katalizira dismutaciju superoksida, koji oštećuje stanice pri visokim koncentracijama, u vodikov peroksid, koji se potom transformira u vodu i kisik pomoću katalaze ili glutation peroksidaze, i molekularni kisik (Younus, 2018). U ovome istraživanju, ekstrakt dobričice nije statistički značajno ($p>0,05$) utjecao na aktivnost superoksid dismutaze bubrega, jetre i slezene, no, svakako je važno da nije došlo do smanjenja aktivnosti superoksid dismutaze što bi pogodovalo daljnjem tijeku oksidacijskih oštećenja biomolekula. Zdrav organizam ima mogućnost prilagodbe u održavanju razine reaktivnih radikala i antioksidacijske zaštite te bi učinak ekstrakta dobričice na promjene aktivnosti superoksid dismutaze mogao biti jasnije vidljiv kod bolesti povezanih s oksidacijskim stresom (Berendika i sur., 2022). Chung i suradnici (2020) također nisu odredili značajan utjecaj ekstrakta dobričice na aktivnost superoksid dismutaze u jetri zdravih miševa tijekom 28 dana tretmana u koncentracijama od 0,25, 0,50 i 1,00 g kg⁻¹. Xiao i suradnici (2021) objavili su da Hitrechol[®], komercijalni proizvod koji sadrži ekstrakt dobričice i namijenjen je za otapanje žučnih kamenaca, nije značajno utjecao na aktivnost superoksid dismutaze jetre kod miševa u kombinaciji s normalnom prehranom, nakon tretmana od 3 tjedna. Što se tiče ružmarinske kiseline, kao dominantnog polifenolnog spoja dobričice, De Oliveira i suradnici (2012) su objavili da tretman miševa ružmarinskom kiselinom u jednoj dozi u koncentraciji od 100 mg kg⁻¹ nije značajno utjecao na aktivnost superoksid dismutaze u jetri.

5.6.7. Utjecaj ekstrakta dobričice na parametre genotoksičnosti u krvi i organima

Molekula DNK zaštićena je organiziranjem u kromatinske strukture djelovanjem poliamina i histona te u normalnim staničnim uvjetima ne sadrži lomove i strukturne promjene, a kada ta zaštita nije dovoljna dolazi do različitih oštećenja (Lee i sur., 1995). Za primarna oštećenja DNK najčešće se koristi metoda alkalnog komet testa, provedena i u ovome istraživanju. Primarna oštećenja mogu biti spontana i inducirana, pri čemu spontana oštećenja nastaju



tijekom odvijanja normalnih metaboličkih procesa u stanicama i najčešće uključuju krivo sparene baze, nesporene baze, gubitak baza, oksidacijska oštećenja, tautomerizaciju i deaminaciju, dok su inducirana oštećenja rezultat djelovanja genotoksičnih spojeva (Lindahl, 1993). ROS-ovi mogu oštetiti DNK izazivajući modifikacije baza, delecije, kromosomske preraspodjele, hiper- i hipometilaciju te modulaciju ekspresije gena (Dizdaroglu i Jaruga, 2012; Valko i sur., 2004). DNK je vjerojatno biološki najznačajnija „meta“ oksidacijskog napada od strane slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta koji se neprestano stvaraju *in vivo*. Kontinuirano oksidacijsko oštećenje DNK značajno doprinosi razvoju različitih oboljenja povezanih sa starenjem, a procijenjeno je najmanje nekoliko stotina "oksidacijskih udaraca" dnevno na DNK svake od 5×10^{13} stanica u ljudskom tijelu (Halliwell, 2000).

U ovome istraživanju, ekstrakt dobričice je u svim ispitivanim koncentracijama (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹) pokazao izraženo zaštitno djelovanje na oksidacijska oštećenja DNK u krvi, bubrezima, slezeni i jetri štakora, vidljivo statistički značajnim ($p < 0,05$) smanjenjem dužine repa i intenziteta repa DNK, u odnosu na kontrolu. Dužina repa predstavlja udaljenost na koju su otputovali fragmenti DNK tijekom elektroforeze i proporcionalna je oštećenju DNK, ali se intenzitet repa, koji predstavlja udjel DNK u repu kometa, smatra najtočnijim parametrom procjene oštećenja DNK jer pokazuje linearan odnos s frekvencijom lomova DNK (Collins, 2004). Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti da ekstrakt dobričice posjeduje visoki potencijal kao izvor prirodnih antioksidansa za prevenciju nastanka bolesti izazvanih slobodnim radikalima, naročito kod bolesti izazvanih oksidacijskim oštećenjima DNK. Za uporabu u terapijske svrhe u liječenju takvih bolesti, potrebno je provesti daljnja istraživanja koristeći modele životinja u kojima su inducirana takva oboljenja. Za razliku od rezultata dobivenih *in vitro* ispitivanjem genotoksičnosti na kontinuiranim humanim staničnim linijama (poglavlje 5.5.5.), na *in vivo* sustavima dokazan je protektivni učinak ekstrakta dobričice na genetski materijal krvi, bubrega, slezene i jetre.

Serpeloni i suradnici (2008) objavili su zaštitni učinak ekstrakata različitih biljnih vrsta roda *Miconia*, u koncentracijama od 200, 400 i 540 mg kg⁻¹, na oštećenja DNK u krvi miševa, kao posljedica prisustva tanina i polifenolnih spojeva u ekstraktima, ali i njihovog sinergističkog djelovanja. Polifenolni spojevi mogu se vezati na DNK na mjestima koja bi inače reagirala s aktivnim metabolitima karcinogena, a time i različitim reaktivnim oblicima radikala, što je ključni korak za početak karcinogeneze. Također, kada se polifenoli vežu na DNK, njihove molekule mogu biti postavljene na takav način da učinkovito neutraliziraju reaktivne intermedijere koji se približavaju kritičnim mjestima na DNK ili pak mogu izravno stupiti u



interakciju s krajnjim reaktivnim metabolitima doniranjem svojih elektrona i čineći ih neaktivnima (Ke i sur., 2013). U slučaju ekstrakta dobričice, zaštitni učinak na oštećenja DNK također se može najvećim dijelom pripisati prisustvu polifenolnih spojeva, naročito ružmarinske kiseline, premda je važno sinergističko djelovanje svih bioaktivnih spojeva. Zaštitni učinak ružmarinske kiseline na oštećenja DNK stanica mozga miševa u jednoj dozi u koncentraciji od 100 mg kg⁻¹ objavljen je u radu De Oliveira i suradnika (2012), a Pereira i suradnici (2005) objavili su da ružmarinska kiselina u koncentracijama od 2 i 8 mg kg⁻¹ ne uzrokuje oštećenje DNK u krvi štakora. Coelho i suradnici (2015) istraživali su antiepileptičku aktivnost ružmarinske i kafeinske kiseline u koncentracijama od 1, 4 i 8 mg kg⁻¹ na miševima tretiranim s pentetrazolom, i utvrdili njihov protektivni učinak na oštećenja DNK u moždanoj kori. Nadalje, rutin je u istraživanju Patil i suradnika (2014), u koncentracijama od 10 i 20 mg kg⁻¹ kroz 5 dana, pokazao protektivno djelovanje na oštećenja DNK, izazvana zračenjem, u krvi miševa.

5.7. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem

5.7.1. Toplinske analize polimera

Toplinska stabilnost polimera definirana je kao sposobnost polimernog materijala da se odupre djelovanju topline i da zadrži svoja svojstva, poput čvrstoće, elastičnosti, itd., na određenoj temperaturi, a ovisi o kemijskoj strukturi, stupnju kristalizacije i molekulskoj masi polimera (Król-Morkisz i Pielichowska, 2019). U ovome istraživanju, provedene su toplinske analize, primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) i termogravimetrijske analize (TGA), svih polimernih nosača (djelomično hidrolizirana guar guma, hidrolizat kolagena, karboksimetil celuloza, nutrioza, mucin i ksilan) koji su korišteni tijekom sušenja raspršivanjem, kako bi se odredila njihova prikladnost za ovu tehniku. Rezultati analiza ukazali su na njihovu prikladnost za sušenje raspršivanjem pošto DSC analizom nisu uočeni fenomeni toplinskog prijelaza, a TGA analiza ukazala je na njihovu izrazitu stabilnost pri radnoj temperaturi od 150 °C, koja se koristila u sušenju raspršivanjem. Naime, prema maksimalnim vrijednostima deriviranih termogravimetrijskih krivulja (DTG), temperature maksimalne brzine razgradnje za korištene polimerne nosače bile su u rasponu od oko 220 – 320 °C.

Mudgil i suradnici (2012) provodili su enzimsku hidrolizu guar gume i ispitali toplinska svojstva, primjenom DSC analize, dobivene djelomično hidrolizirane guar gume, i objavili endotermne pikove na 223 i 274 °C povezane s pirolizom uzorka. Što se tiče hidrolizata



kolagena, Schmidt i suradnici (2020) objavili su da tijekom DSC analize nisu primijećeni fenomeni toplinskog prijelaza, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Kao što je već spomenuto, kod DSC termograma karboksimetil celuloze, mucina i ksilana također nisu uočeni toplinski prijelazi, premda se u dostupnoj literaturi mogu pronaći drugačiji podaci. Tako su primjerice, El-Sayed i suradnici (2011) naveli relativno široki endotermni staklasti prijelaz karboksimetil celuloze oko 75 °C i egzotermni kristalni prijelaz pri 278 °C, dok su Mumuni i suradnici (2020) utvrdili endotermni pik kod mucina na 95 °C što ukazuje na njegovu temperaturu taljenja. U istraživanju Kurian i suradnika (2015), DSC analizom uzorka ksilana, detektirani su egzotermni pikovi u rasponu od 243 do 245 °C te razgradnja u rasponu od 97 do 313 °C. Za razliku od spomenutih istraživanja, u ovome istraživanju, na DSC termogramima sve promjene iznad 200 °C smatrane su rezultatima pirolize te su kao takve ukazivale na kemijske, a ne na fizikalne promjene.

5.7.2. Viskoznost otopina nosača za sušenje raspršivanjem

Viskoznost je jedan od važnih parametara otopina nosača kod sušenja raspršivanjem. Pogodan nosač za inkapsulaciju mora imati nisku viskoznost otopine pri visokom udjelu suhe tvari. Previsoka viskoznost otopine može dovesti do začepjenja mlaznice raspršivača uzrokujući time nepotpuno isparavanje otapala i nisko iskorištenje procesa, a može imati i negativan utjecaj na morfologiju čestica (Esposito i sur., 2020). Za otopine djelomično hidrolizirane guar gume karakteristične su niske vrijednosti viskoznosti zbog primijenjenog postupka hidrolize. Mudgil i suradnici (2012) naveli su da je viskoznost 1 %-tne vodene otopine djelomično hidrolizirane guar gume 4 mPa s, dok je u ovome istraživanju, 4 %-tna otopina djelomično hidrolizirane guar gume, pripremljena u ekstraktu dobričice, imala viskoznost od 0,922 mPa s. Najveća viskoznost od 3,508 mPa s detektirana je u otopini djelomično hidrolizirane guar gume pripremljenoj s dodatkom karboksimetil celuloze, što je očekivano budući da je karboksimetil celuloza učinkoviti zgušnjivač koji se hidratizira u hladnoj i toploj vodi s kapacitetom vezanja većim od 100 g vode po g osiguravajući stabilno vezanje vode tijekom dugih razdoblja skladištenja (Phillips i Williams, 2021). Ne postoji ograničenje u koncentraciji karboksimetil celuloze koji se može koristiti u prehrambenim proizvodima, ali treba je koristiti u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (BeMiller, 2019) te se najčešće koristi u udjelu od 0,5 % (Rahman i sur., 2021).

5.7.3. Fizikalna i morfološka svojstva inkapsulata

Prinos procesa sušenja raspršivanjem većinom je prvi parametar koji ukazuje na uspješnost procesa, a uzima u obzir udjel suhe tvari otopine nosača koja je prevedena u inkapsulat. U



ovome istraživanju, binarne otopine nosača, pripremljene dodatkom različitih polimera (hidrolizat kolagena, karboksimetil celuloza, nutrioza, mucin i ksilan) u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom, rezultirale su prinosom većim od 50 %, što je prema Bhandari i suradnicima (1997), jedna od karakteristika uspješnog sušenja raspršivanjem. Najveći prinos, čak 96,07 %, ostvaren je dodatkom hidrolizata kolagena u sustav nosača što može biti posljedica njegove izrazito visoke toplinske stabilnosti utvrđene TGA analizom. Naime, od svih ispitivanih polimera, hidrolizat kolagena pokazao je najvišu temperaturu maksimalne brzine razgradnje od 318 °C (poglavlje 4.7.1.). Prinos manji od 50 % postignut je koristeći djelomično hidroliziranu guar gumu kao samostalan nosač, što upućuje na činjenicu da se izborom nosača te kombinacijom različitih polimera uvelike može utjecati na iskorištenje procesa. Osim nosača, prema Magri i suradnicima (2019), prinos sušenja raspršivanjem može se povećati povišenjem ulazne temperature i smanjenjem količine ili veličine kapljica uzorka koji se suši. Sukladno tome, Sun i suradnici (2020) provodili su inkapsulaciju karvakrola sušenjem raspršivanjem, uz binarnu otopinu pektina i natrijevog alginata kao nosač, pri različitim ulaznim temperaturama (100, 130, 160 i 190 °C) i zabilježili najveću inkapsulacijsku učinkovitost od 82,79 % pri najvišoj ispitivanoj temperaturi, dok je kod najniže temperature, ona iznosila tek 45,73 %. Nadalje, Jafari i suradnici (2010) provodili su inkapsulaciju ribljeg ulja sušenjem raspršivanjem koristeći maltodekstrin, u kombinaciji s modificiranim škrobom i izolatom proteina sirutke, kao nosač te objavili da su veće čestice (> 63 µm) sadržavale na površini više neinkapsuliranog ulja u odnosu na manje čestice (< 38 µm). Nadalje, suha tvar inkapsulata sušenih raspršivanjem također je izrazito bitna i poželjno je da bude veća od 95 % osiguravajući njihovu stabilnost (Clarke, 2003). U istraživanju Piovesana i Noreña (2018), sušenje raspršivanjem ekstrakta čaške hibiskusa na 140 °C i korištenjem 10 % otopine djelomično hidrolizirane guar gume, rezultiralo je inkapsulatom vrlo niskog udjela vode (2,5 %), u usporedbi s liofiliziranim ekstraktom (6 %). Uspješno provedeno sušenje raspršivanjem rezultira konačnim proizvodom niskih vrijednosti aktiviteta vode i visokog udjela suhe tvari (Shishir i Chen, 2017).

Određivanje močivosti i kontaktnog kuta vode inkapsulata može ukazati na njihovu topljivost i na izraženost hidrofilnog ili hidrofobnog ponašanja. U ovome istraživanju, utvrđena je visoka korelacija ($R^2 = 0,85$) između močivosti i kontaktnog kuta vode jer je nisko vrijeme močivosti bilo praćeno i nižim vrijednostima kontaktnog kuta vode. Površine koje s kapljicom vode tvore kontaktni kut manji od 90 ° smatraju se hidrofilnima, dok su one koje tvore kontaktni kut veći od 90 ° hidrofobne (Latthe i sur., 2014). U ovome istraživanju, kontaktni kut manji od 90 ° određen je kod svih uzoraka što ukazuje na površinu koja se može vlažiti. Najveća vrijednost



od 87 °, što je vrlo blizu granice kuta za hidrofobnu površinu, izmjerena je u uzorku s dodatkom karboksimetil celuloze. Liu i suradnici (2021) također su objavili povećanje hidrofobnosti filma na bazi škroba s dodatkom više od 10 % karboksimetil celuloze pri čemu je najviša vrijednost kontaktnog kuta od 66,8 ° uočena kod uzorka s 35 % karboksimetil celuloze. Ramírez i suradnici (2012) objavili su slične vrijednosti kontaktnog kuta za jestive filmove na bazi karboksimetil celuloze na kori jabuke (76,68 °) i dunje (81,88 °). Karboksimetil celuloza je anionski, u vodi topljivi derivat celuloze, u kojoj su, umjesto atoma vodika iz hidroksilnih skupina celuloze, prisutne anionske karboksimetil skupine (Rahman i sur., 2021). Unatoč svojoj polarnoj strukturi, celuloza ima izuzetno nisku topljivost u vodi zbog nerazgranatih lanaca glukoze povezanih vodikovim vezama (Gubitosi i sur., 2017) koje tada nisu dostupne za interakcije s molekulama vode. Pošto je dio hidroksilnih skupina u molekuli karboksimetil celuloze zamijenjen karboksimetilnim skupinama, moguće je da one utječu na povećanje topljivosti karboksimetil celuloze, ali i dalje uz zadržavanje hidrofobnijeg karaktera. Izražen hidrofilni karakter ostalih inkapsulata može se objasniti strukturom korištenih polimera. Naime, visoka topljivost hidrolizata kolagena rezultat je prisustva peptida male molekulske mase koji nastaju hidrolizom (Khiari i sur., 2014), dok je nutrioza sastavljena od dekstrina topljivih u vodi (Lefranc-Millot i sur., 2012). Nadalje, topljivosti mucina u vodi pogoduje prisutnost glikoziliranih regija u strukturi (Boegh i Nielsen, 2015), dok je korišteni ksilan bio niskog stupnja polimerizacije (< 30), te kao takav topiv u vodi (Hettrich i sur., 2017).

Nasipna gustoća je važan parametar prahova kod skladištenja, obrade, pakiranja i distribucije, a ovisi o obliku, svojstvima površine i veličini čestica. Glatki i ujednačeni prah ima veću nasipnu gustoću što ukazuje na manju količinu zraka između šupljina čestica čime se sprječava oksidacija sastojaka i povećava stabilnost pri skladištenju (Šavikin i sur., 2021; Lourenço i sur., 2020). U ovome istraživanju, statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje nasipne gustoće uzrokovao je jedino dodatak hidrolizata kolagena u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom što može biti posljedica sljepljivanja čestica inkapsulata čime se stvara više slobodnog zračnog prostora u uzorku. Isto tako, u istraživanju Mounsey i suradnika (2012), čestice hidroliziranog natrijevog kazeinata sušene raspršivanjem bile su sklonije sljepljivanju u odnosu na čestice nehidroliziranog natrijevog kazeinata i posljedično su imale manje nasipnu gustoću. Nadalje, u ovome istraživanju, inkapsulat pripremljen samo s djelomično hidroliziranom guar gumom pokazao je izrazito loša svojstva tecivosti i kohezivnosti, dok je dodatak svih istraživanih polimera u sustav statistički značajno ($p < 0,05$) poboljšao svojstva tecivosti, što je potvrđeno smanjenjem Carrovog indeksa, kao i svojstva kohezivnosti inkapsulata, smanjenjem



Hausnerovog omjera. Niže vrijednosti Hausnerovog omjera impliciraju na bolju kohezivnost čestica inkapsulata koja je u korelaciji s boljim karakteristikama protočnosti. Prahovi koji imaju bolju protočnost pokazuju nisku tendenciju daljnje konsolidacije te se time može prevenirati prekid proizvodnje u industrijskim razmjerima (Lourenço i sur., 2020).

Ako će se dobiveni inkapsulati koristiti u tekućim disperzijama, kao konačnom obliku za konzumaciju, tada podaci o zeta potencijalu mogu pružiti informacije o njihovom agregacijskom ponašanju. Niska apsolutna vrijednost zeta potencijala ukazuje na to da su električno odbijanje ili steričke barijere među česticama nedovoljne što može dovesti do agregacije (Liu i sur., 2018). U ovome istraživanju, najizraženija promjena zeta potencijala uočena je dodatkom karboksimetil celuloze u sustav nosača što je rezultiralo inkapsulatom s najnižom vjerojatnošću zeta potencijala (-22,03 mV). Karboksimetil celuloza je negativno nabijena čemu doprinosi prisutnost deprotoniranih karboksilnih skupina u strukturi (Arumughan i sur., 2021). Ibrahim i suradnici (2020) također su objavili da modifikacija površine nano nula valentnog željeza s karboksimetil celulozom, u obliku 2 %-tne otopine, uzrokuje negativan zeta potencijal u rasponu pH od 5 do 11. Tako su, na primjer, kod pH 7, za nano nula valentno željezo bez modifikacije zabilježili zeta potencijal od 6,9 mV, a modifikacijom karboksimetil celulozom, kod istih uvjeta, -30,3 mV (Ibrahim i sur., 2020).

Kod svih tehnika inkapsulacije općenito je cilj formulirati inkapsulate što manje veličine zbog lakše daljnje manipulacije i inkorporacije u hranu ili ostale proizvode. Očekivani promjer čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem je u rasponu od 1 do 15 μm (Man i sur., 1999). U radu Piñón-Balderrama i suradnika (2020), navedena je klasifikacija prahova sušenih raspršivanjem prema veličini na male (1 – 5 μm), srednje (5 – 25 μm) i velike (10 – 60 μm) pri čemu se navodi da sustav raspršivanja ima najveći utjecaj na veličinu čestica, odnosno što su veće kapljice koje se suše, veće su i čvrste čestice. Elversson i Millqvist-Fureby (2005) objavili su da se veličina čestica može smanjiti i smanjenjem koncentracije otopine nosača i korištenjem nosača veće topljivosti, dok Tonon i suradnici (2008) ističu da može doći i do aglomeracije čestica što također rezultira promjenom veličine čestica. U ovome istraživanju, dobiveni su inkapsulati srednje veličine čestica (7,73 – 10,05 μm) i dodatak istraživanih polimera u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecao na veličinu čestica. Čestice slične veličine dobivene sušenjem raspršivanjem, pripremljene s djelomično hidroliziranom guar gumom, točnije od 8,43 μm , s inkapsuliranim polifenolima kože grožđa, određene su u radu Kuck i Noreña (2016), te od 9,16 μm , s inkapsuliranim ekstraktom češnjaka, u radu Kinalski i Noreña (2019). Budući da kapljice uzorka nemaju ujednačenu veličinu kada



se raspršuju, visoka polidisperznost, odnosno heterogena raspodjela njihove veličine, karakteristika je čestica dobivenih sušenjem raspršivanjem (Toledo Hijo i sur., 2014), što je potvrđeno i u ovome istraživanju pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Prema Tonon i suradnicima (2010), čestice manje veličine dobivene sušenjem raspršivanjem smještaju se između većih i stoga zauzimaju manje prostora što rezultira velikom nasipnom gustoćom. U ovome istraživanju, uzorak pripremljen dodatkom karboksimetil celuloze, koji je imao i najizraženiju heterogenu raspodjelu veličine čestica, nije se značajno razlikovao od ostalih po vrijednostima nasipne gustoće što znači da su se male čestice smjestile između većih, dok bi najviše praznog prostora između čestica moglo biti u uzorku pripremljenim dodatkom hidrolizata kolagena, budući da je kod istog određena najmanja nasipna gustoća. U istraživanju Pieczykolan i Kurek (2019), sušenje raspršivanjem korišteno je za inkapsulaciju antocijana aronije, koristeći kombinacije maltodekstrina s arapskom gumom, inulinom, beta-glukanom, pektinom i guar gumom kao nosače, i dobivene čestice s najizraženijom heterogenom raspodjelom veličine, točnije one pripremljene s dodatkom arapske gume, bile su okarakterizirane i najmanjom nasipnom gustoćom, što upućuje da se manje čestice nisu smjestile između većih te da je prostor između njih ostao prazan.

Ispitivanjem morfologije SEM analizom, u inkapsulatu pripremljenom s djelomično hidroliziranom guar gumom vidljivi su nepravilni oblici, ali bez udubljenja i pukotina, kao i glatka površina, dok su binarni sustavi nosača rezultirali formuliranjem inkapsulata relativno sferičnih oblika, također bez udubljenja ili pukotina, ali smanjene glatkoće površine. Kuck i Noreña (2016) objavili su sferičan oblik inkapsulata ekstrakta češnjaka sušenog raspršivanjem i pripremljenog s djelomično hidroliziranom guar gumom kao nosačem, i s izrazitom malom pojavom konkaviteta. Izrazito su nepoželjne formulacije inkapsulata s vrlo poroznom površinom, hrapave ili napukle strukture jer takvi sustavi imaju loša svojstva tecivosti i zbog veće kontaktne površine podložniji su reakcijama degradacije (Rosenberg i sur., 1985). U uzorku pripremljenom uz dodatak mucina primijećena je pojava konkaviteta. Konkavitet najčešće nastaje uslijed brzog isparavanja vode tijekom sušenja raspršivanjem (Kuck i Noreña, 2016).

5.7.4. FT-IR analiza nosača, ekstrakta i inkapsulata

Zbog prisustva polifenolnih spojeva, IR spektar ekstrakta dobričice pokazao je karakterističan IR apsorpcijski pojas hidroksilnih skupina na 3397 i 3237 cm^{-1} . Budući da se kemijski i bioaktivni sastav dobričice temelji na različitim spojevima, IR-spektar ekstrakta prosjek je svih frekvencija koje odgovaraju karakterističnim vibracijama prisutnih spojeva. Iz dobivenih



spektara inkapsulata vidljivo je da su sve glavne vrpce spojeva ekstrakta dobričice također prisutne u inkapsulatima što ukazuje da nije bilo kemijskih promjena u ekstraktu tijekom inkapsulacije, kao ni u sustavima polimera s ekstraktom.

Uspoređujući IR spektar djelomično hidrolizirane guar gume sa spektrom inkapsulata pripremljenog s istim (Slika 67), uočene su promjene u intenzitetu vrpce u području od 1300 do 1200 cm^{-1} , području gdje se opažaju OH savijajuće vibracije primarnih alkoholnih skupina ugljikohidratnih jedinica. Razlike u intenzitetu nekih od ovih vrpce mogu se povezati sa stvaranjem vodikovih veza između hidroksilnih skupina djelomično hidrolizirane guar gume i hidroksilnih skupina polifenolnih spojeva ekstrakta dobričice. Također, uočene su slične promjene u IR spektrima djelomično hidrolizirane guar gume kada je ona kombinirana kao nosač s drugim polimerima (Slika 67), što također može ukazati na stvaranje vodikovih veza između hidroksilnih skupina djelomično hidrolizirane guar gume te hidroksilnih ili karbonilnih skupina drugih polimera. Prema Mudgil i suradnicima (2012), hidroksilne skupine u strukturi djelomično hidrolizirane guar gume odgovorne su za njezine interakcije vodikovim vezama s drugim spojevima.

S druge strane, uspoređujući IR spektre inkapsulata pripremljenih s dodatkom hidrolizata kolagena i mucina s IR spektrom čistih polimera, primijećen je značajan pomak vibracija istežanja karbonilnih skupina. U slučaju hidrolizata kolagena uočen je pomak apsorbancije od 1648 cm^{-1} na 1639 cm^{-1} (Slika 68), dok je u slučaju mucina uočen pomak od 1649 cm^{-1} na 1632 cm^{-1} (Slika 69). Karbonilna skupina je akceptor vodikove veze te se ovaj pomak u regiji amida I može objasniti sudjelovanjem karbonilnih skupina hidrolizata kolagena i mucina u vodikovim vezama (Hanachi i sur., 2022; Shin i Kim, 2021; Hosseini i sur., 2017). Vrpce u području amida II (N–H savijanje i C–N rastezanje) zabilježene su na 1540 cm^{-1} i 1547 cm^{-1} i u IR spektrima čistih polimera i inkapsulata (Slike 68 i 69).

5.7.5. *Bioaktivna svojstva inkapsulata*

Inkapsulacijska učinkovitost vrlo je važan parametar u procjeni uspješnosti inkapsulacijske tehnike, a odnosi se na udjel aktivne tvari koji je zadržan unutar inkapsulacijskog sustava, u odnosu na udjel aktivne tvari u otopini nosača. Inkapsulacijska učinkovitost sušenja raspršivanjem ovisi o svojstvima nosača i aktivnog spoja, ali i o procesnim uvjetima, uključujući ulaznu i izlaznu temperaturu zraka, vlažnost, brzinu protoka zraka i otopine te vrstu raspršivanja (Mohammed i sur., 2020). U ovome istraživanju, sušenje raspršivanjem uspješno je primijenjeno u inkapsulaciji polifenolnih spojeva dobričice s izrazitom visokim vrijednostima inkapsulacijske učinkovitosti. Naročito visoka učinkovitost inkapsulacije (94,64



%) ružmarinske kiseline, kao najzastupljenijeg polifenolnog spoja dobričice, postignuta je koristeći binarnu otopinu nosača s dodatkom mucina. Mucin je glikoprotein s molekulskom masom u rasponu 0,5 – 20 MDa i koji u svojoj strukturi sadrži oko 80 % ugljikohidrata te 20 % proteina (Bansil i Turner, 2006), a sposoban je tvoriti vodikove veze zbog prisustva ostataka šećera u svojoj strukturi (Lousinian i sur., 2018). U ovome istraživanju, FT-IR analiza ukazala je na potencijalno stvaranje vodikovih veza između hidroksilnih skupina polifenolnih spojeva dobričice i karbonilnih skupina mucina, pomakom apsorpcijskih vrpca vibracija istezanja karbonilnih skupina (*poglavlje 5.7.4.*), što zasigurno doprinosi visokoj inkapsulacijskoj učinkovitosti ružmarinske kiseline. Važnost formiranja vodikovih veza, uz van der Waalsove sile, između funkcionalnih skupina nosača i polifenolnih spojeva, točnije na primjeru esterificiranog škroba i polifenola sirka, u postizanju visoke inkapsulacijske učinkovitosti navedeno je i u radu García-Gurrola i suradnika (2019). Autori (García-Gurrola i sur., 2019) su potvrdili stvaranje vodikovih veza između polifenolnih spojeva i škroba rastezanjem veza između OH skupina škroba i H skupina polifenolnih spojeva također FT-IR analizom. Uz to, naveli su i da uvođenje fosfatnih grupa u škrob dodatno utječe na povećanje inkapsulacijske učinkovitosti polifenola, uslijed njihove sposobnosti delokalizacije što uzrokuje da kisik s većom snagom privlači protone OH skupine polifenola, povećavajući interakciju između nosača i polifenolnih spojeva.

Potencijal primjene djelomično hidrolizirane guar gume kao nosača za inkapsulaciju polifenolnih spojeva sušenjem raspršivanjem nedovoljno je istražen. Među dostupnim podacima, Piovesana i Noreña (2018) odredili su inkapsulacijsku učinkovitost od 60,63 % za polifenole čaške hibiskusa inkapsulirane sušenjem raspršivanjem na 140 °C i korištenjem 10 % otopine djelomično hidrolizirane guar gume, dok su Kuck i Noreña (2016), koristeći iste uvjete, odredili inkapsulacijsku učinkovitost od 81,61 % za polifenole pokožice grožđa. Među ispitivanim polimerima, primjena sušenja raspršivanjem do sada je objavljena i za karboksimetil celulozu, nutriozu i ksilan. Karboksimetil celuloza korištena je kao nosač u sušenju raspršivanjem na 140 °C i kao 1 % otopina u radu Castro-López i suradnika (2021) za inkapsulaciju polifenola konjske rotkvice, s inkapsulacijskom učinkovitošću od 34,61 %, a primjena ksilana u kombinaciji s Eudragit® S100, kao nosačem za 5-aminosalicilnu kiselinu, uz primjenu međupovršinske umrežene polimerizacije i sušenja raspršivanjem, navedena je u radu Silva i suradnika (2013). Nutrioza je korištena u radu Samborska i suradnika (2020), gdje se sušenje raspršivanjem nije koristilo u svrhu inkapsulacije, već kao jedan od oblika konzerviranja i dobivanja praškastog koncentrata jabuke i meda, pogodnih fizikalno-kemijskih



svojstava. U istome radu, nutrioza se navodi kao nosač od sve većeg interesa pošto kao rezistentni škrob posjeduje prebiotička svojstva. Prema dostupnim informacijama, nije zabilježena primjena hidrolizata kolagena i mucina kao nosača u sušenju raspršivanjem, ali opisana je njihova primjena u drugim tehnikama inkapsulacije. Ocak (2020) je u radu koristio hidrolizat kolagena u kombinaciji s arapskom gumom, kao nosač za inkapsulaciju eteričnog ulja grčkog origana, koristeći metodu složene koacervacije, dok su Feng i suradnici (2023) objavili povećanje inkapsulacijske učinkovitosti polifenola čaja dodatkom hidrolizata kolagena u sustav s alginatom koristeći ionsko geliranje. Mucin je kao nosač korišten u radu Mumuni i suradnika (2020) u kombinaciji s kitozanom, u svrhu formuliranja nanočestica inzulina metodom samogeliranja.

Jedna od svrha inkapsulacije je i zaštita polifenolnih spojeva od degradacije tijekom probave pod utjecajem pH, enzima i žučnih soli, što u konačnici osigurava njihovu veću bioraspoloživost. U ovome istraživanju provedena je simulirana probava inkapsulata u želucu i tankom crijevu, praćena postepenim otpuštanjem polifenola (ukupni polifenoli i hidroksicimetne kiseline). Kod svih inkapsulata, osim onog pripremljenog s dodatkom karboksimetil celuloze, uočeno je brzo otpuštanje polifenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina u kratkom vremenu, već u želucu, dok je binarni sustav djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze rezultirao kontroliranim i kontinuiranom otpuštanjem polifenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina. Rezultati se mogu objasniti činjenicom da su djelomično hidrolizirana guar guma, hidrolizat kolagena, nutrioza, mucin i ksilan visoko topljivi u vodi i kontakt s vodom uništava njihovu inkapsulacijsku strukturu (Işik i sur., 2014). U prilog tome ide i njihova visoka močivost te hidrofilna površina (*poglavlje 4.7.3.*). Vrlo vjerojatno nizak pH i prisutnost pepsina u želucu nemaju značajan utjecaj na razaranje inkapsulacijske strukture, već je to rezultat visoke topljivosti inkapsulata uslijed primjene hidrofilnih nosača. Promjena močivosti i hidrofilnog karaktera inkapsulata statistički je značajno ($p < 0,05$) promijenjena dodatkom karboksimetil celuloze u sustav nosača, što je u konačnici rezultiralo najpoželjnijom kinetikom otpuštanja polifenola i hidroksicimetnih kiselina u uvjetima simulirane probave u želucu i tankom crijevu. Od svih istraživanih fizikalnih svojstava, hidrofilna priroda polimera pokazala je najveći utjecaj na otpuštanje polifenolnih spojeva iz inkapsulata tijekom simulirane probave. U svrhu inkorporacije inkapsulata polifenola u hranu, poželjno je koristiti polimere topive u vodi zbog izbjegavanja mogućnosti zaostajanja organskih otapala, ali budući da ti polimeri obično rezultiraju brzim otpuštanjem inkapsuliranih spojeva tijekom probave, svakako je poželjno korištenje binarnih sustava



nosača, od kojih jedan polimer posjeduje izraženiji hidrofoban karakter, kao što je karboksimetil celuloza.

5.8. Liposomalna inkapsulacija

5.8.1. Fizikalna i morfološka svojstva inkapsulata

Liposomi su nano-strukture sferičnog oblika koje se sastoje od jednog ili više koncentričnih fosfolipidnih dvoslojeva koji okružuju vodenu jezgru. Budući da su netoksični i biorazgradivi, predstavljaju izrazito poželjan sustav za isporuku bioaktivnih spojeva. Liposomi se najčešće karakteriziraju fizikalnim parametrima, kao što su veličina, indeks polidisperzije i zeta potencijal. Veličinu liposoma određuje broj lamela, odnosno broj lipidnih dvosloja, te se ista kreće u rasponu od 20 nm do čak i više od 1000 nm (Guimarães i sur., 2021). U ovome istraživanju, prazni liposomi i liposomalni inkapsulati imali su promjer veći od 100 nm što ukazuje na prisutnost najmanje jednog dvostrukog lipidnog dvosloja (Bryła i sur., 2015). Zanimljivo je istaknuti da je dodatak ekstrakta dobričice u liposome rezultirao smanjenjem veličine liposoma sa 192,9 nm na 106,7 nm. Isti učinak inkapsulacije ekstrakta trave ive u liposome objavljen je u radu Šeremet i suradnika (2022). Indeks polidisperzije (PDI) ukazuje na raspodjelu veličine čestica i homogenost sustava, a prihvatljive vrijednosti su ispod 0,7 (Refai i sur., 2017), što je u ovome istraživanju određeno i kod praznih liposoma (0,33) i kod liposomalnih inkapsulata (0,21). Uz to, oba uzorka pokazala su vrijednosti PDI veće od 0,1 što upućuje na polidisperznu raspodjelu veličine čestica. Prema Luo i suradnicima (2020a), manja veličina čestica i manji PDI ukazuju na homogeniji i stabilniji sustav liposoma, što u ovome radu ide u korist liposomalnih inkapsulata.

Zeta potencijal je parametar koji predstavlja naboj na površini čestica i korelira sa stabilnošću koloidnih suspenzija. Liposomalne suspenzije smatraju se nestabilnima ako je njihov zeta potencijal između -30 i +30 mV što im ne osigurava dovoljnu odbojnu silu za održavanje stabilnog sustava, odnosno izbjegavanje agregacije liposoma (Wang i sur., 2020). Liposomi pripremljeni s fosfatidilkolinom obično imaju neto negativan naboj (Balanč i sur., 2016). Prema dobivenim rezultatima za zeta potencijal, prazni liposomi (-27,98 mV) bili su stabilniji od liposoma s inkapsuliranim ekstraktom (-21,17 mV). Može se zaključiti da je inkapsulirani ekstrakt djelovao na stabilnost liposoma te da je ta promjena zeta potencijala uzrokovana smještajem dijela spojeva ekstrakta dobričice na površinu liposoma, što je potvrđeno FT-IR analizom (*poglavlje 5.8.2.*). Veće vrijednosti veličine, od 405 nm, i slične vrijednosti za PDI,



od 0,35, i zeta potencijal, od -24,8 mV, objavili su González-Ortega i suradnici (2021) za liposomalni inkapsulat ekstrakta listova masline, koristeći Phospholipon 90 G, koji je korišten i u ovome istraživanju.

AFM ima izvanrednu razlučivost u djelićima nanometra i može pružiti 3D sliku liposoma zajedno s detaljima o morfologiji, raspodjeli veličine, homogenosti i stabilnosti (Robson i sur., 2018). U ovome istraživanju, AFM analizom utvrđeno je da su prazni liposomi i liposomalni inkapsulati bili iste visine (5 nm) i sličnih raspona širine (u rasponu od 60 do 460 nm), ali i da je inkapsulacija ekstrakta dobričice potencijalno mogla narušiti sferičan oblik liposoma. AFM analiza ne može pružiti sigurne dokaze za to jer proces pripreme uzorka u AFM-u zahtijeva tapkajući režim rada, kao i sušenje uzorka, što može rezultirati urušavanjem strukture liposoma, agregacijom ili deformacijom (Erami i sur., 2019). Slične vrijednosti visine liposoma, u rasponu od 4 do 12 nm, pripremljenih koristeći Phospholipon 90 G za inkapsulaciju folne kiseline uz dodatak histidina kao sredstva za njeno otapanje, i ovisno o dodatku kolesterola i surfaktanta, objavljene su u radu Batinić i suradnika (2020), kao i pojava spljoštene i urušene strukture liposomalnih inkapsulata.

5.8.2. FT-IR analiza liposoma, ekstrakta i liposomalnih inkapsulata

FT-IR spektroskopija primijenjena je za ispitivanje prisutnosti različitih interakcija između funkcionalnih skupina ekstrakta dobričice i liposoma. IR spektar praznih liposoma pokazao je nekoliko karakterističnih vrpca fosfatidilkolina. Uočene su vrpce istezanja CH i CH₂ na 2923 i 2853 cm⁻¹ koje proizlaze iz lanaca masnih kiselina. Mala i oštra vrpca na 3009 cm⁻¹ pripisuje se rastezanju CH veze N-CH₃ skupine. Druga karakteristična vrpca na 1735 cm⁻¹ odgovara karbonilnoj skupini (C=O) esterske veze između glicerola i masnih kiselina. Vrpce na 1239 i 1088 cm⁻¹ posljedica su asimetričnog i simetričnog rastezanja PO₂, dok se vrpca na 1060 cm⁻¹ može povezati s C–O vibracijama istezanja. Kvarterna amonijeva skupina kolinskog dijela rezultira vrpcoma na 968 i 921 cm⁻¹ koje odgovaraju asimetričnom i simetričnom rastezanju C–N veze. Iako je FT-IR analiza obavljena neposredno nakon procesa liofilizacije, vidljiva je prisutnost vode u uzorku. Široka vrpca na 3368 cm⁻¹ (istezanje OH) popraćena je manjom, simetričnom trakom OH na 1648 cm⁻¹ što ukazuje na postojanje kemijski vezane vode na površini liposoma, koja vjerojatno stupa u interakciju s fosfatnim skupinama putem vodikovih veza.

IR spektar liposomalnih inkapsulata uglavnom je sličio spektru praznih liposoma što može biti posljedica relativno niske koncentracije ekstrakta, ali i „zaštitnog“ učinka (Hosseini i sur., 2019), jer su spojevi ekstrakta dobričice topljivi u vodi i očekuje se da će biti potpuno obavijeni



dvoslojevima fosfolipida. PO₂ asimetrična vrpca na 1238 cm⁻¹ označena je kao posebno osjetljiva na bilo kakve strukturne promjene fosfatidilkolinskih vezikula, što je izraženije u hidratiziranom obliku (Pohle i sur., 2001). Frías i suradnici (2006) objavili su da arbutin, glikolizirani hidrokinon, utječe na obje frekvencije PO₂ rastezljivih vrpce ovisno o njegovom položaju unutar dvosloja fosfatidilkolina. U istome istraživanju, vrpca povezana sa simetričnim istezanjem PO₂ na 1088 cm⁻¹ bila je pogođena samo ako je arbutin bio izvana, dok je na simetričnu vrpcu istezanja na 1238 cm⁻¹ utjecao položaj arbutina unutra i izvana što je dovelo do njezinog pomaka. Polifenolni spojevi dobričice također mogu djelovati na isti način, uzrokujući lagani pomak PO₂ asimetrične rastezljive vrpce. Taj se pomak može uočiti u spektru praznih liposoma s vršnom vrpcom na 1238 cm⁻¹ koja se kod liposomalnih inkapsulata pomaknula na 1243 cm⁻¹. Druga vidljiva promjena u IR spektru liposomalnih inkapsulata jest prisutnost vrpce niskog intenziteta povezane s karboksilnim skupinama (na oko 1600 cm⁻¹), koja jasno potječe od spojeva ekstrakta dobričice, što ukazuje na činjenicu da neki spojevi s karboksilnim skupinama mogu biti „zarobljeni” na površini liposoma. Daljnji dokaz da su neki spojevi ekstrakta ugrađeni na površinskoj razini liposoma jest smanjenje intenziteta vrpce povezanih s vezanom vodom (na 3368 i 1648 cm⁻¹). Spojevi koji su sposobni za interakciju putem vodikovih veza mogu zamijeniti molekule vode adsorbirane na površini liposoma. Zbog složenosti ekstrakta i njegove relativno niske koncentracije, nemoguće je u potpunosti razumjeti strukturu liposoma, ali dokazi koji proizlaze iz FT-IR analize sugeriraju da spojevi ekstrakta nisu inkapsulirani samo unutar liposoma, već se nalaze i na njihovoj površini.

5.8.3. *Bioaktivna svojstava inkapsulata*

Struktura liposoma, odnosno postojanje lipidnih dvoslojeva, organiziranih oko unutarnje vodene jezgre s polarnim skupinama glave usmjerenima prema unutarnjoj i vanjskoj vodenoj fazi, omogućuje liposomima inkapsulaciju hidrofilnih, hidrofobnih i amfifilnih spojeva (Guimarães i sur., 2021). U ovome istraživanju, liposomalna inkapsulacija pokazala se vrlo uspješnom u inkapsulaciji polifenolnih spojeva dobričice koji, s obzirom da je korišten vodeni ekstrakt dobričice, posjeduju hidrofilni karakter. Upravo zbog hidrofilnog karaktera analiziranih polifenolnih spojeva, može se zaključiti da su oni u liposomalnoj strukturi većinski smješteni u hidrofilnoj jezgri, a manji dio, kao što je utvrdila FT-IR analiza, nalazi se na površini liposoma. U prilog ovome zaključku ide i rad Fadel i suradnika (2011) koji su istraživali interakcije ružmarinske kiseline i liposoma 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfokolina te zaključili da ružmarinska kiselina nije značajno uzrokovala promjenu propusnosti i fluidnosti membrana te da je ona uglavnom smještena među glavnim polarnim skupinama lipida. U istraživanju Ota



i suradnika (2011), kafeinska kiselina također nije imala značajan učinak na krutost i dinamiku fosfolipidnih lanaca u strukturi stanične membrane, dok je npr. za *p*-kumarinsku kiselinu, koja ima manje izražen hidrofilni karakter, zaključeno da aromatski prsten u njenoj strukturi može biti djelomično umetnut u lipidni dvosloj. Dakle, ne može se sa sigurnošću tvrditi da mali dio polifenola dobričice nije smješten također i unutar lipidnog dvosloja, ali pretpostavka jest da je većina njih smještena unutar hidofilne jezgre.

Liposomalna inkapsulacija pokazala se uspješnom tehnikom za inkapsulaciju ružmarinske kiseline i u drugim istraživanjima. U istraživanju Baranauskaite i suradnika (2018), liposomalna inkapsulacijska učinkovitost ružmarinske kiseline, ekstrahirane iz origana, bila je u rasponu od 65 %, u slučaju liposoma pripremljenih samo s fosfatidilkolinom (Phospholipon 90H), do 90 %, kod liposoma pripremljenih s fosfatidilkolinom i dimiristoil fosfatidilglicerolom u omjeru 1:1. Yücel i suradnici (2019) postigli su inkapsulacijsku učinkovitost od 62 % za ružmarinsku kiselinu u liposomalnim inkapsulatima primjenom metode hidratacije suhog filma i upotrebom dipalmitoil fosfatidilkolina i kolesterola. Kafeinska kiselina, također prisutna u ekstraktu dobričice, uspješno je inkapsulirana u liposome, s učinkovitošću od 75 %, u istraživanju Dejeu i suradnika (2021), koristeći natrijev kolat, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfokolin i 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3 fosfokolin, uz dodatak kolesterola i fosfatidilkolina. Malo niže vrijednosti učinkovitosti liposomalne inkapsulacije za klorogensku kiselinu, od 60,5 %, objavljene su u radu Zhang i suradnika (2021) koji su u tu svrhu koristili sojin lecitin i kolesterol. Nadalje, u istraživanju Bonechi i suradnika (2018), liposomalna inkapsulacija nije se pokazala prikladnom tehnikom inkapsulacije za rutin, identificirani flavonoid u dobričici, pošto je učinkovitost inkapsulacije iznosila tek oko 13 % koristeći različite kombinacije 1,2-dioloil-sn-glicero-3-fosfokolina, 1,2-di-(9Z-oktadece-noil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2 dioloil-sn-glicero-3-fosfata i 1,2-dioloil-3 trimetilamonij-propana, ali je u istraživanju Lopez-Polo i suradnika (2020), upotrebom pročišćenog fosfatidilkolina iz soje, postignuta viša inkapsulacijska učinkovitost za rutin od oko 85 %.

Zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta dobričice u inkapsuliranom obliku dokazano je TBARS metodom snažnom inhibicijom peroksidacije lipida, u odnosu na prazne liposome. Snažan antioksidacijski kapacitet liposomalnog inkapsulata posljedica je visokog udjela inkapsuliranih polifenolnih spojeva dobričice. U ovome istraživanju, nakon primijenjenih 200 pulseva UV zračenja, stvaranje malondialdehida u liposomalnim inkapsulatima bilo je 1,76 puta manje nego u praznim liposomima, odnosno intenzitet peroksidacije lipida smanjen je za oko 43 % zbog antioksidacijskog djelovanja inkapsuliranog



ekstrakta dobričice. Balanč i suradnici (2015) koristili su UV zračenje i TBARS metodu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta inkapsuliranog resveratrola i utvrdili da inkapsulirani resveratrol inhibira peroksidaciju lipida za 95 % nakon 3 sata zračenja, u usporedbi s praznim liposomima. Također, u istraživanju Šeremet i suradnika (2022), nakon primijenjenih 130 pulseva UV zračenja, stvaranje malondialdehida u liposomalnim inkapsulatima ekstrakta trave ive bilo je čak 3,53 puta manje nego u praznim liposomima, odnosno intenzitet peroksidacije lipida bio je smanjen za oko 72 % uslijed inkapsulacije ekstrakta.

Liposomalna inkapsulacija ekstrakta dobričice omogućila je kontinuirano i kontrolirano otpuštanje ružmarinske kiseline tijekom simulacije probave u želucu i tankom crijevu. Iako je poznato da nizak pH i prisutnost pepsina u SGF-u nemaju značajan utjecaj na liposome (Rowland i sur., 1980), uočeno je brže otpuštanje ružmarinske kiseline u SGF-u od očekivanog što se može objasniti rezultatima FT-IR analize prema kojoj je dio ružmarinske kiseline smješten i na površini liposoma. Kontrolirano otpuštanje nastavljeno je u SIF-u pošto žučne soli i pankreatin u SIF-u utječu na fizikalne karakteristike i morfologiju liposoma zbog hidrolize fosfolipida enzimima pankreatina i interakcija žučnih soli s komponentama liposoma (Liu i sur., 2012). Detergentna svojstva žučnih soli uzrokuju poremećaj fosfolipidnih dvoslojeva u liposomima (Liu i sur., 2012) što doprinosi otpuštanju inkapsuliranih spojeva iz liposomalne strukture. U istraživanju Liu i suradnika (2015), cjelovitost liposoma ostala je nepromijenjena tijekom probave u SGF-u, dok je u SIF-u došlo do oštećenja membrana i otpuštanje slobodnih masnih kiselina, olakšano prisutnošću žučnih soli, što je doprinijelo oslobađanju inkapsuliranog albumina iz liposoma.

5.9. *In vivo* biološki učinci liposomalnog ekstrakta dobričice

Primjena liposoma kao sustava za oralnu isporuku različitih lijekova i bioaktivnih spojeva ima brojne prednosti, kao što su mogućnost inkapsulacije spojeva različite polarnosti, biokompatibilnost, veliki izbor dostupnih fosfolipida i drugih lipida koji pružaju fleksibilnost liposomalnih formulacija i čijim se varijacijama mogu modificirati inkapsulacijska učinkovitost, stabilnost i brzina otpuštanja aktivne tvari iz liposomalnih sustava u organizmu. S obzirom na sličnost liposomalne membrane sa staničnim membranama, pretpostavka je da liposomi mogu poboljšati prodiranje aktivnih spojeva kroz kožnu barijeru i oralnu mukoznu membranu (Lee, 2020).



Tijekom razvoja liposomalnih sustava za oralnu isporuku, prema literaturnim podacima, vidljivo je da su se javljali određeni problemi, kao što su nestabilnost liposoma u probavnom sustavu i njihova slaba propusnost kroz crijevni epitel zbog relativno velike veličine (Lee, 2020). Istraživanja vezana uz liposomalnu oralnu isporuku stagnirala su tijekom 1980-ih godina zbog razočaravajućih rezultata vezanih uz isporuku inzulina (Wearley, 1991). Međutim, razvojem naprednih tehnologija modifikacija, broj znanstvenih radova s temom liposomalne oralne isporuke je porastao, iako radovi koji se odnose na liposomalnu oralnu isporuku aktivnih spojeva čine samo 5 – 6 % ukupnog broja radova vezanih uz liposome. Liposomalna isporuka još uvijek ne postiže zadovoljavajuće poboljšanje oralne bioraspodjelivosti peptida i proteinskih lijekova, ali izrazito je obećavajuća za oralnu isporuku hidrofobnih spojeva jer liposomi mogu solubilizirati spojeve koji su slabo topljivi u vodi, zaštititi ih od razgradnje u probavnom sustavu i povećati propusnost kroz membranu epitelnih stanica. Međutim, većina objavljenih radova vezana je uz *in vitro* studije te nedostaju *in vivo* farmakokinetički rezultati (Lee, 2020). U ovome istraživanju, provedeno je *in vivo* ispitivanje bioloških učinaka ekstrakta dobričice u inkapsuliranom obliku, u svrhu usporedbe u odnosu na slobodni, neinkapsulirani ekstrakt u istoj koncentraciji (250 mg kg^{-1}), određujući iste parametre oksidacijskog stresa (antioksidacijski kapacitet, intenzitet karbonilacije proteina i peroksidacije lipida, koncentracija ukupnog glutaciona i aktivnost superoksid dismutaze).

Uspoređujući antioksidacijsko djelovanje s ekstraktom iste koncentracije u slobodnom, neinkapsuliranom obliku, liposomalni inkapsulat je pokazao izraženije antioksidacijsko djelovanje smanjenjem intenziteta peroksidacije lipida bubrega i jetre ženskih štakora. Isto kao i ekstrakt u slobodnom obliku u koncentraciji od 250 mg kg^{-1} , izuzev u slezeni ženskih štakora, ni liposomalni ekstrakt nije uzrokovao statistički značajne promjene ($p > 0,05$) u koncentraciji ukupnog glutaciona u bubrezima, jetri i slezeni, dok je kod jetre ženskih štakora rezultirao statistički značajnim ($p < 0,05$) smanjenjem aktivnosti superoksid dismutaze, a što nije uočeno kod ekstrakta u slobodnom obliku. Tretman štakora ekstraktom dobričice (250 mg kg^{-1}) u liposomalnom obliku uzrokovao je povećanje antioksidacijskog kapaciteta bubrega muških i ženskih štakora.

Garcia de Figueiredo-Rinhel i suradnici (2019) navode da su manji liposomi s homogenom raspodjelom veličine, odnosno s nižim indeksom polidisperzije, i neutralnim površinskim nabojem karakterizirani većom biokompatibilnošću. Oni su u svojem istraživanju formulirali liposome, s inkapsuliranim ekstraktom biljke *Baccharis dracunculifolia*, veličine 182,5 nm, indeksa polidisperzije 0,13 i zeta potencijala $-0,08 \text{ mV}$ te naveli da kao takvi posjeduju dobru



fizikalno-kemijsku stabilnost i vrijeme zadržavanja u krvi zbog slabog prepoznavanja i uklanjanja od strane imunološkog sustava. Također, doze ekstrakta (9 mg kg^{-1}) i kafeinske kiseline (3 mg kg^{-1}) davane štakorima u liposomalnom obliku bile su znatno niže od onih doziranih u slobodnom obliku (oko 5 i 16 puta manje) sa sličnim protuupalnim učincima (Garcia de Figueiredo-Rinhel i sur., 2019). Liposomi manji od 100 nm rjeđe ulaze u interakcije s proteinima plazme, imaju duži poluživot u krvi jer izbjegnu hvatanje specijaliziranih stanica retikuloendotelna sustava, dok se veći liposomi brže eliminiraju iz krvi djelovanjem istih stanica (Bozzuto i Molinari, 2015). U ovome istraživanju, liposomalni inkapsulati dobričice bili su veličine 106,7 nm i indeksa polidisperzije 0,2 (poglavlje 4.8.1.), što upućuje na fizikalno-kemijsku stabilnost, ali negativan površinski naboj ($-21,17 \text{ mV}$) (poglavlje 4.8.1.) mogao bi negativno djelovati na vrijeme zadržavanja liposoma u krvi. U istraživanju Zhao i suradnika (2011), nakon intravenske injekcije, neutralni liposomi imali su duže vrijeme cirkulacije u krvotoku u usporedbi s kationskim liposomima kod kojih je uočena brza agregacija u serumu i kasnije nakupljanje u plućima zbog čega su neutralni liposomi imali izraženiju antikancerogenu učinkovitost. Campbell i suradnici (2018) i Hayashi i suradnici (2020) objavili su da su neutralni liposomi veličine od 100 nm slobodno cirkulirali u embrijima zebrice, dok su anionski liposomi ulazili u interakcije sa stanicama retikuloendotelna sustava i makrofagima u krvi, a kationski liposomi su se brzo uklonili iz cirkulacije kombinacijom nespecifičnih staničnih interakcija, odnosno adsorpcijom na anionsku površinu stijenki krvnih žila, i/ili uklanjanjem djelovanjem stanicama retikuloendotelna sustava. Stoga, u ovome istraživanju, u svrhu povećanja biološke aktivnosti liposomalnog ekstrakta dobričice, daljnja istraživanja svakako bi trebala uključiti modifikaciju površinskog naboja liposoma. Površinska modifikacija liposoma može se provesti ugradnjom površinski aktivnih tvari, kao što su žučne soli i Tween 80, ili prevlačenjem površine polimerima, kao što su kitozan i polietilen glikol, ili oblikovanjem višeslojnih ili multivezikularnih liposoma (Nguyen i sur., 2016).

Objavljen je mali broj *in vivo* znanstvenih istraživanja vezanih uz oralnu primjenu biljnih ekstrakata i polifenola u liposomalnom obliku te njihov utjecaj na oksidacijski stres. Zhang i suradnici (2023) objavili su da oralna primjena liposomalnog inkapsulata luteolina obloženog kitozanom uzrokuje smanjenje ukupnih triglicerida i kolesterola, a povećava aktivnost enzima katalaze, superoksid dismutaze i glutation peroksidaze u jetri miševa. U istraživanju Shariare i suradnika (2022), oralna primjena liposomalnog inkapsulata ekstrakta biljke *Blumea lacera*, u dozi od 25 mg kg^{-1} kroz 14 dana, uzrokovala je smanjenje intenziteta peroksidacije lipida jetre i seruma kod štakora s CCl_4 -induciranom ozljedom jetre, kao i povećanje aktivnosti enzima



katalaze, superoksid dismutaze i glutation peroksidaze. U istraživanju Feng i suradnika (2016), oralna primjena liposomalnog inkapsulata klorogenske kiseline u dozi od 100 mg kg⁻¹ uzrokovala je povećanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze i glutation peroksidaze u jetri miševa s CCl₄-induciranom ozljedom jetre, kao i smanjenje koncentracije malondialdehida.

5.10. Formulacija funkcionalnih čokolada

5.10.1. Udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu

Kakaov maslac je na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju i ima relativnu nisku točku taljenja, u rasponu od 27 do 35 °C, zbog specifičnog sastava triglicerida (Jahurul i sur., 2013). Najzastupljenije masne kiseline kakaovog maslaca su palmitinska (P; 26 %), stearinska (S; 36 %) i oleinska (O; 34 %) kiselina te su najzastupljeniji trigliceridi 2-oleopalmitostearat (POS), 2-oleodistearat (SOS) i 2-oleodipalmitat (POP) (Jahurul i sur., 2013; Lipp i sur., 2001). Trigliceridi čine > 95 % kakaovog maslaca, a u manjem udjelu nalaze se masne kiseline u slobodnom obliku, fosfolipidi, nesaponirajući spojevi (viši alifatski alkoholi, steroli, pigmenti), digliceridi te drugi trigliceridi (Beg i sur., 2017; Jahurul i sur., 2013). U slučaju formulacija čokolada, idealna mast trebala bi biti kruta na sobnoj temperaturi i trebala bi se brzo taliti u ustima. Udjel čvrstih triglicerida pri temperaturi ispod 25 °C karakterizira tvrdoću kakaovog maslaca, dok udjel čvrstih triglicerida u rasponu temperatura od 25 do 30 °C upućuje na njegovu otpornost prema zagrijavanju. U rasponu temperatura od 27 do 35 °C intenzivno taljenje kakaovog maslaca stvara osjećaj hlađenja u ustima i dolazi do oslobađanja okusa. Visoki udjel čvrstih triglicerida pri temperaturama većim od 35 °C uzrokuje voštani okus (Zhang i sur., 2015).

U ovome istraživanju, inkapsulat dobiven sušenjem raspršivanjem (uzorak DHGG_MUC) i liposomalni inkapsulat homogenizirani su u kakaovom maslacu u udjelima od 10 i 20 % s ciljem njihove uspješnije inkorporacije u matriks čokolade, odnosno s ciljem prekrivanja njihove površine mastima za što je postavljena hipoteza da bi trebalo omogućiti bolje očuvanje inkapsulata tijekom konzumacije i probave čokolade. Prema dobivenim rezultatima (Slika 88) može se zaključiti da dodatak inkapsulata u kakaov maslac nije negativno utjecao na njegov profil taljenja jer je zadržana karakteristična otpornost prema zagrijavanju u rasponu temperatura od 25 do 30 °C, intenzivnije taljenje bilo je u rasponu od 30 do 35 °C te su u konačnici određeni izrazito niski (2,19 – 5,56 %) udjeli čvrstih triglicerida pri temperaturi od 35 °C. Profil taljenja kakaovog maslaca, izražen kao udjel čvrstih triglicerida pri različitim



temperaturama, u skladu je s literaturom (Zhang i sur., 2015). Torbica i suradnici (2006) odredili su udjel čvrstih triglicerida u kakaovom maslacu od oko 80, 70, 40 i 2 % pri temperaturama od 20, 25, 30 i 35 °C.

5.10.2. Bioaktivni sastav čokolada

Čokolada je omiljeni proizvod svih generacija potrošača, a ujedno i dobar matriks za dodatno obogaćivanje bioaktivnim spojevima. Čokolada, naročito ona s visokim udjelom kakaovih dijelova, i sama predstavlja bogat izvor polifenolnih spojeva, od kojih su najznačajniji flavan-3-oli, antocijani i proantocijanidini (Tan i sur., 2021). Velika prednost uporabe čokolade kao matriksa za isporuku bioaktivnih sastojaka je mogućnost maskiranja neugodnih okusa, dok je najveći nedostatak visoki udjel šećera u klasičnim formulacijama. Sukladno zdravijim prehranbenim navikama suvremenog potrošača, potražnja za čokoladama bez šećera u novije vrijeme sve više raste, potičući prehrambenu industriju i znanstvenu zajednicu da razvijaju formulacije čokolada smanjenog udjela šećera i bez šećera korištenjem različitih sladila (npr. stevija, polioli, itd.). Međutim, razvoj formulacija čokolada bez šećera veliki je izazov jer odsutnost šećera modificira fizikalno-kemijska svojstva čokolada važna za njihovu prihvatljivost (Faccineto-Beltrán i sur., 2021). U ovome istraživanju, novoformulirane čokolade sadržavale su 65,5 % kakaovih dijelova i 33 % šećera te su obogaćene s inkapsulatima polifenolnog ekstrakta dobričice, onog dobivenog sušenjem raspršivanjem u udjelu od 2 % te liposomalnog inkapsulata u udjelu od 4 %. Dva uzorka čokolada (Č_SR1 i Č_L1) pripremljena su na način da su inkapsulati dodani direktno u čokoladnu masu, a dva uzorka (Č_SR2 i Č_L2) pripremljena su tako da su inkapsulati prethodno homogenizirani u kakaovom maslacu te je potom takav obogaćeni kakaov maslac dodan u zamjes za čokoladnu masu (Slika 26). HPLC analizom novoformuliranih čokolada utvrđena je prisutnost metilksantina teobromina i kafeina u svim čokoladama. Teobromin je određen kao najzastupljeniji bioaktivni spoj čokolada u uskom rasponu od oko 16 – 18 mg g⁻¹, a udjel kafeina bio je niži u rasponu od oko 2,5 mg g⁻¹. Kao najzastupljeniji polifenolni spoj, u svim čokoladama, određen je (-)-epikatehin, iz skupine flavanola, u rasponu od oko 3,5 – 4,5 mg g⁻¹. Alañón i suradnici (2016) određivali su udjele bioaktivnih spojeva u komercijalnim čokoladama te su kod čokolade s 60 % kakaovih dijelova odredili udjele teobromina, kafeina i epikatehina od 8,4, 2,3 i 2,5 mg g⁻¹, dok su kod čokolada s udjelom kakaovih dijelova od 72 %, ti udjeli bili 12,7, 2,9 i 3,6 mg g⁻¹. Bioaktivni sastav čokolada, prije svega ovisi o sastavu kakaovih zrna, koja se koriste kao ishodišna sirovina za proizvodnju, koji varira ovisno o području uzgoja, zrelosti zrna, klimatskim uvjetima tijekom rasta te sezoni berbe i vremenu skladištenja nakon berbe, kao i o kasnijim fazama prerade zrna,



od kojih fermentacija, sušenje i prženje naročito utječu na bioaktivni sastav zrna (Urbańska i sur., 2019; Oracz i sur., 2015).

HPLC analizom čokolada s dodatkom inkapsulata određen je raznovrsniji i bogatiji polifenolni profil od čokolade bez dodatka inkapsulata. Od polifenolnih spojeva dobričice, u čokoladama s dodatkom inkapsulata, identificirane su klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina i rutin. Udjel polifenolnih spojeva bio je viši u čokoladama pripremljenima uz dodatak inkapsulata dobričice sušenog raspršivanjem u usporedbi s čokoladama s dodatkom liposomalnog inkapsulata. To je i očekivano, s obzirom da inkapsulat sušen raspršivanjem sadrži viši udjel ekstrakta dobričice, od oko 20 %, dok je u liposomalnim inkapsulatima taj udjel niži, od oko 5 %, a treba uzeti u obzir i njihovo različito zadržavanje u inkapsulacijskim sustavima.

Nadalje, u ovome istraživanju provedena je simulirana probava čokolada u ustima, želucu i tankom crijevu, praćena otpuštanjem ružmarinske kiseline, u cilju provjere kontinuiranog i kontroliranog otpuštanja bioaktivnih spojeva inkapsulata i nakon inkorporacije u prehrambeni proizvod. Rezultati su pokazali da su oba inkapsulata ekstrakta dobričice to omogućila i nakon inkorporacije u matriks čokolada. U ovome istraživanju, kao što je ranije navedeno, inkapsulati ekstrakta dobričice homogenizirani su u kakaovom maslacu s ciljem njihove uspješnije inkorporacije u matriks čokolada (Č_SR2 i Č_L2), odnosno u cilju prekrivanja njihove površine mastima za bolje očuvanje inkapsulata tijekom konzumacije i probave čokolade. Promjene u kinetici otpuštanja ružmarinske kiseline uočene su kod uzoraka čokolada s dodatkom inkapsulata dobivenog sušenog raspršivanjem u SGF-u od 60 do 120 minuta, gdje je kod uzorka Č_SR2 uočeno bolje zadržavanje ružmarinske kiseline unutar inkapsulata, odnosno, njeno sporije otpuštanje, što je u skladu s postavljenom hipotezom. U slučaju čokolada s dodatkom liposomalnog inkapsulata, promjena je uočena jedino u 30-oj minuti SGF-a, gdje je sporije otpuštanje ružmarinske kiseline ponovno uočeno kod čokolade u čijoj pripremi je inkapsulat bio prethodno homogeniziran u kakaovom maslacu. S obzirom na dobivene rezultate, uz uspješno obogaćivanje polifenolnim spojevima dobričice, može se zaključiti da su inkapsulacijski sustavi uspješno inkorporirani u čokoladne proizvode pošto je ostvareno i kontinuirano i kontrolirano otpuštanje ciljanog spoja u simuliranim uvjetima probave.

Čokolade se najčešće obogaćuju polifenolnim spojevima inkorporacijom različitih biljnih ekstrakata. Poliński i suradnici (2022) su dodatkom praha Matcha čaja i konjske rotkvice u bijelu čokoladu, u udjelima od 1, 2, 3 i 4 %, znatno obogatili njen polifenolni sastav. Dodatak praha Matcha čaja u udjelu od 4 % rezultirao je čak 32,5 puta većim udjelom polifenola u odnosu na bijelu čokoladu bez ikakvih dodataka, ali samo ako je prah bio dodan u fazi



temperiranja, jer dodatkom u fazi končiranja, udjel polifenola bio je 18,6 puta veći nego u kontrolnoj čokoladi. Żyżelewicz i suradnici (2021) istraživali su dodatak liofiliziranog ekstrakta borovnice, maline, kupine, komine nara i cikle u udjelu od 1 % u tamnu i mliječnu čokoladu. Najveće povećanje ukupnih polifenola detektirano je dodatkom ekstrakta borovnice, s 0,9 na 1,6 mg EGK g⁻¹ kod mliječne čokolade, i s 1,4 na 2,3 mg EGK g⁻¹ kod tamne čokolade. Dodatkom ekstrakta borovnice čokolade su bile dodatno obogaćene antocijanima cijanidin-3,5-*O*-diglukozidom, cijanidin-3-*O*-ksilozidom, delphinidin-3,5-*O*-diglukozidom i pelargonidin-3,5-*O*-diglukozidom, koji nisu prirodno prisutni u kakaovom zrnu. Lončarević i suradnici (2019) razvili su formulacije bijele čokolade s povećanim udjelom ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta dodatkom ekstrakta zelenog čaja, sušenog raspršivanjem uz maltodekstrin kao nosač, u udjelima od 60, 80 i 100 g kg⁻¹. Dodatak ekstrakta zelenog čaja od 100 g kg⁻¹ rezultirao je povećanjem udjela ukupnih polifenola s 0,41 na 2,73 mg EGK g kg⁻¹ i antioksidacijskog kapaciteta s 1,22 na 16,12 mmol Trolox kg⁻¹. Što se tiče ekstrakta dobričice, objavljena je jedino inkorporacija ekstrakta, kao jednog od sastojka punila čokoladnih pralina, u kombinaciji s različitim vrstama meda, u radu Šeremet i suradnika (2023). Čokoladne praline, u kojima je bilo oko 7,5 % ekstrakta dobričice, uspješno su obogaćene polifenolnim spojevima dobričice budući da je detektirana ružmarinska kiselina u udjelu od 1,05 do 1,84 µg g⁻¹.

5.10.3. Reološka svojstva čokolada

Reološka svojstva čokolade najviše ovise o raspodjeli veličine čvrstih čestica i samoj formulaciji, odnosno udjelu pojedinih sastojaka, kao i o postupku proizvodnje. Casson-ov model je matematički model koji se najčešće koristi za procjenu reoloških svojstava čokolade pri čemu se računaju Casson-ova granica tečenja i plastična viskoznost (Afoakwa i sur., 2007). Aeschlimann i Beckett (2000) navode očekivane vrijednosti Casson-ove plastične viskoznosti za mliječne čokolade u rasponu od 2 do 6 Pa s i za tamne čokolade od 2 do 4 Pa s, te očekivane vrijednosti granice tečenja za mliječne čokolade u rasponu od 2 do 18 Pa, a za tamne čokolade od 4 do 32 Pa. Prema istraživanju Lončarević i suradnika (2021), Casson-ova plastična viskoznost bijele čokolade (2,25 Pa s) slična je onoj mliječne i tamne, a vrijednost granice tečenja (1,78 Pa) manja je od očekivanih za mliječnu i tamnu. Glicerina i suradnici (2016) istraživali su viskoznost tamne, mliječne i bijele čokolade te utvrdili da je tamna čokolada najviskoznija (9,62 Pa s), potom mliječna (1,55 Pa s) i da je najmanje viskozna bijela čokolada (0,59 Pa s).

U ovome istraživanju, vrijednosti Casson-ove viskoznosti (1,29 – 1,86 Pa s) i granice tečenja (8,15 – 13,56 Pa) za sve čokolade bile su u očekivanom rasponu za tamne čokolade



(Aeschlimann i Beckett, 2000). Najmanje vrijednosti viskoznosti i granice tečenja određene su u uzorku pripremljenim s dodatkom liposomalnog inkapsulata (Č_L2), prethodno homogeniziranog u kakaovom maslacu. Moguće da je uzrok smanjenja viskoznosti fosfolipid s izrazito visokim udjelom ($\geq 94\%$) fosfatidilkolina, koji je korišten u formulaciji liposoma, i koji je pokazao emulgirajuća svojstva u ovoj tehnici pripreme i smanjio viskoznost. Zanimljivo je istaknuti da kod pripreme čokolada s direktnim dodatkom liposomalnog inkapsulata u čokoladnu masu (Č_L1), taj učinak nije detektiran. Lee i suradnici (2002) navode da emulgatori omogućuju bolje miješanje hidrofилnih čestica (npr. šećera) s lipofilnom masnom fazom u čokoladi što smanjuje viskoznost i trenje između čestica. Nadalje, očigledno je da tehnika pripreme čokolada ima utjecaj na reološka svojstva, pošto je i kod uzorka Č_SR2, gdje je inkapsulat sušen raspršivanjem također homogeniziran u kakaovom maslacu, uočeno statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje Casson-ove viskoznosti i granice tečenja, u odnosu na uzorak bez dodatka inkapsulata. Mogući razlog smanjenja reoloških parametara kod ovih uzoraka i kod načina pripreme gdje su inkapsulati, prije dodatka u čokoladnu masu, bili homogenizirani u kakaovom maslacu, jest smanjenje slobodne masne faze u matriksu čokolade uslijed oblaganja čestica inkapsulata kakaovim maslacem. Pošto statistički značajno smanjenje viskoznosti i granica tečenja nije uočeno ($p > 0,05$) kod uzoraka Č_SR1 i Č_L1, u odnosu na čokoladu bez dodatka inkapsulata, može se zaključiti da su čestice inkapsulata bile manje obložene kakaovim maslacem, u odnosu na uzorke Č_SR2 i Č_L2, što može potvrditi i početnu hipotezu da će inkapsulati biti uspješnije inkorporirani u matriks čokolade prethodnom homogenizacijom u kakaovom maslacu u cilju prekrivanja njihove površine mastima. Međutim, uzorci Č_SR1 i Č_L1 pokazali su veće vrijednosti granice tečenja (13,23 i 13,56 Pa) u odnosu na uzorke Č_SR2 i Č_L2 (9,13 i 8,15 Pa) što može značiti da su u uzorcima Č_SR1 i Č_L1 ostvarene snažnije interakcije između sastojaka u odnosu na uzorke Č_SR2 i Č_L2.

Promjene reoloških parametara čokolada uslijed dodatka inkapsulata su očekivane pošto su u matriks čokolada dodani novi čvrsti sastojci. Lončarević i suradnici (2019) koristili su inkapsulat ekstrakta zelenog čaja, dobivenog sušenjem raspršivanjem i uz maltodekstrin kao nosač, za obogaćivanje bijele čokolade polifenolnim spojevima te su detektirali povećanje Casson-ove viskoznosti s 0,56 Pa s na 1,24 Pa s nakon dodatka inkapsulata u udjelu od 100 g kg^{-1} . Međutim, u istraživanju Didar (2021), dodatak liposomalnog inkapsulata vitamina D3, u udjelu od 5 μg na 10 g čokolade, nije značajno utjecao na promjenu Casson-ove viskoznosti tamne čokolade (1,26 i 1,25 Pa s). Također, Polat i suradnici (2020) nisu zabilježili promjene u reološkim svojstvima bijelih čokolada, u pogledu Casson-ove granice tečenja i plastične



viskoznosti, nakon dodatka inkapsulata mikroalge *Nannochloropsis oculata* sušenog raspršivanjem, s maltodekstrinom kao nosačem, u udjelu od 0,125 g do 0,75 g na 100 g čokolade. Na osnovu toga zaključili su da dodatak inkapsulata neće uzrokovati promjene u procesu proizvodnje čokolade poput razine miješanja, vremena temperiranja, končiranja i oblikovanja.

5.10.4. Svojstva taljenja i teksturalna svojstva čokolada

Kao što je već spomenuto (poglavlje 5.10.1.), kakaov maslac se većinski sastoji od tri triglicerida koji mogu kristalizirati u šest polimorfnih oblika, koji se navode rimskim brojevima - I, II, III, IV, V i VI, ili grčkim slovima - α , α , β_2 , β_1 , β_2 i β_1 . U čokoladama je najpoželjniji V oblik kakaovog maslaca, odnosno β_2 oblik, a upravo je i cilj procesa temperiranja postići njegovu dominaciju u čokoladi, u odnosu na druge polimorfne oblike. Pravilnim temperiranjem čokoladna masa postiže veću brzinu skrućivanja i kontrakciju hlađenjem, a nakon potpunog pravilnog skrućivanja dobiva se konačni proizvod željene kakvoće - čokoladne boje, visokog sjaja, pune strukture, ravne i glatke površine, potrebne čvrstoće, bolje otpornosti na dodir prstiju, trajnosti i održivosti (Ghazani i Marangoni, 2021; Afoakwa, 2016).

Jedna od najčešćih metoda za određivanje polimorfnih oblika kakaovog maslaca u čokoladama je diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC). DSC je vrsta toplinske analize koja daje informacije o toplini/entalpiji taljenja tijekom zagrijavanja čokolade. Točka u kojoj entalpija taljenja doseže svoj maksimum predstavlja maksimalnu toplinu koju čokolada apsorbira i definira se kao temperatura taljenja čokolade. Temperatura taljenja koristi se za procjenu glavnog polimornog oblika kakaovog maslaca u čokoladi budući da svaki kristalni oblik karakteriziraju jedinstvene temperature taljenja ili rasponi prema njihovoj termodinamičkoj stabilnosti (Ioannidi i sur., 2021). U ovome istraživanju, DSC analiza je u svim uzorcima čokolada ukazala na prisutnost IV (β_1) oblika kakaovog maslaca čije se taljenje očekuje u rasponu temperatura od 26 do 28 °C (Ostrowska-Ligęza i sur., 2023) i dominaciju V (β_2) oblika kakaovog maslaca čiji je raspon taljenja od 29 do 34 °C (Calva-Estrada i sur, 2020; Afoakwa, 2016). Prisutnost polimornog oblika VI (β_1), koji može nastati od V oblika kakaovog maslaca, u očekivanom rasponu temperatura od 34 do 39 °C (Calva-Estrada i sur., 2020) nije uočena. S obzirom na dominaciju oblika V kakaovog maslaca u odnosu na druge, može se zaključiti da je proces temperiranja svih čokolada proveden ispravno i da dodatak inkapsulata u čokolade nije rezultirao značajnom promjenom u temperaturi maksimuma taljenja oblika V kakaovog maslaca. Međutim, dodatak inkapsulata je u svim čokoladama uzrokovao povećanje energije potrebne za potpuno taljenje čokolade, vidljivo povećanjem entalpije taljenja.



Ostrowska-Ligeża i suradnici (2019) istraživali su svojstva taljenja tamne, mliječne i bijele čokolade primjenom DSC analize te su u svim čokoladama detektirali endotermi pik povezan s taljenjem oblika V kakaovog maslaca, u rasponu temperatura od 31,0 do 32,4 °C, što su povezali s pravilno provedenim procesom temperiranja. Kod DSC krivulja mliječne i bijele čokolade detektirali su i endotermi pik povezan s taljenjem mliječne masti, pri maksimalnoj temperaturi taljenja oko 28 °C, koja je uzrokovala smanjenje temperature početka taljenja čokolade. Radi usporedbe, početak taljenja tamnih čokolada detektiran je pri temperaturama od 26,5 i 27,9 °C, mliječnih pri 22,7 i 24,1 °C, dok je početak taljenja bijele čokolade bio pri 20,5 °C. Autori su kao zaključak naveli i da, osim vrste masti u čokoladi, na svojstva taljenja čokolada utječe i udjel masti te da što je udjel masti manji, niža je i temperatura taljenja.

Inkorporacija novih sastojaka u matriks čokolade može utjecati na njen profil taljenja. Međutim, Polat i suradnici (2020) nisu detektirali promjene u svojstvima taljenja bijelih čokolada nakon dodatka inkapsulata mikroalge *Nannochloropsis oculata*, sušenog raspršivanjem uz maltodekstrin kao nosač, u udjelu od 0,125 g do 0,75 g na 100 g čokolade. Drugačiji rezultati objavljeni su u radu Didar (2020) gdje je uočeno smanjenje maksimalne temperature taljenja bijele čokolade povećanjem udjela inkapsulata nara (1, 2, 3, 4, i 5 g na 200 g čokolade), pripremljenog koacervacijom pektina i želatine. Kod bijele čokolade bez dodatka inkapsulata, maksimalna temperatura taljenja iznosila je 34,5 °C, a dodatkom inkapsulata nara u udjelu od 5 g na 200 g čokolade, ista se smanjila na 32,8 °C. Dodatak različitih polimera, kao npr. želatina, škrob, etilceluloza, ksantan, itd., mogu utjecati na povećanje temperature taljenja čokolade i na taj način omogućiti formulaciju čokolada otpornijih na toplinu. Polimeri u tom slučaju najvjerojatnije formiraju mrežu koja fizički sprječava istjecanje kakaovog maslaca iz čokolade pri povišenim temperaturama, a pošto su polimeri većinom hidrofilni i kao takvi ne vežu masti, malo je vjerojatno da dolazi do kemijskih interakcija masti i polimera (Fadilah i sur., 2021; Stortz i Marangoni, 2011). U ovome istraživanju, a i u istraživanju Polat i suradnika (2020) i Didar (2020), taj učinak uslijed dodatka polimera u čokolade nije uočen.

Tvrdoća je jedan od pokazatelja dobro provedenog temperiranja čokolade. Na tvrdoću čokolade utječe profil kristalnih oblika kakaovog maslaca, kao i veličina kristala, te udjel pojedinih sastojaka čokolade (Polat i sur., 2020). U ovome istraživanju, jedino je dodatak liposomalnog inkapsulata, prethodno homogeniziranog u kakaovom maslacu (Č_L2), rezultirao statistički značajnim ($p < 0,05$) smanjenjem tvrdoće, s 18286,75 g na 14100,37 g, u odnosu na čokoladu bez inkapsulata. Manja tvrdoća čokolade upućuje na prisutnost slabije mrežne strukture, odnosno, na čokolade osjetljivije na lomljenje (Glicerina i sur., 2013). Rezultati su u skladu s



reološkim mjerenjima čokolade (*poglavlje 4.10.3.*) gdje je isti uzorak bio okarakteriziran s najmanjom vrijednosti Casson-ove granice tečenja, upućujući na slabije interakcije između njegovih sastojaka u odnosu na druge uzorke. Kod pripreme čokolada s direktnim dodatkom liposomalnog inkapsulata u čokoladnu masu (Č_L1), taj učinak nije zabilježen. Mogući uzrok smanjenja tvrdoće, kao i u slučaju reoloških parametara, je korištenje fosfolipida s izrazito visokim udjelom ($\geq 94\%$) fosfatidilkolina u formulaciji liposoma. U prilog tome zaključku ide istraživanje Ashkezary i suradnika (2018) koji su ustanovili da veći udjel lecitina u recepturi čokolade rezultira čokoladom manje tvrdoće.

U ovome istraživanju, dodatak inkapsulata dobivenog sušenjem raspršivanjem u udjelu od 2 %, neovisno o načinu inkorporacije u čokoladu, nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecao na tvrdoću čokolada, za razliku od istraživanja Lončarević i suradnika (2019) koji su detektirali povećanje tvrdoće bijele čokolade, s 4041,67 g na 4332,00 g, dodatkom inkapsulata zelenog čaja, sušenog raspršivanjem uz maltodekstrin kao nosač, ali u većem udjelu od 10 % (100 g kg^{-1}). Navedeni učinak objasnili su smanjenjem količine slobodne masne faze u uzorku, odnosno povećanjem tankih slojeva masne faze koji prekrivaju veću specifičnu površinu čestica u čokoladi s najvećim udjelom (100 g kg^{-1}) inkapsulata. S druge strane, Ostrowska-Ligęza i suradnici (2019) navode da veći udjel ugljikohidrata u čokoladi može rezultirati manjom tvrdoćom. Uzimajući u obzir dobivene rezultate, udjel inkapsulata sušenih raspršivanjem od 2 % očito je bio nedovoljan da izazove značajne promjene u teksturi čokolade. Barišić i suradnici (2021) zabilježili su manju tvrdoću (oko 9500 g) za tamnu čokoladu, uspoređujući s ovim istraživanjem, što može biti i do sastava čokolada jer su oni u formulacijama koristili više šećera (42 %), a manje kakaove mase (36 %), kakaovog maslaca (21,57 %) i lecitina (0,4 %).

5.10.5. Senzorska svojstva čokolada

Tamna čokolada još uvijek je manje popularna među potrošačima, u odnosu na druge vrste, i čini 31 % globalnog tržišta čokolada, u odnosu na najpopularniju, mliječnu čokoladu koja čini 51 % (Afoakwa, 2016). Tamna čokolada se znatno razlikuje od mliječne čokolade u senzorskom profilu zbog odsutnosti mliječnih sastojaka i nižeg udjela šećera, a većeg udjela kakaovih dijelova što rezultira gorčim okusom i može ograničiti prihvaćanje i preferencije potrošača (Sun-Waterhouse i Wadhwa, 2013; Kennedy i Heymann, 2009). Zanimljivo je istraživanje Torres-Moreno i suradnika (2012a) koji su ispitali prihvatljivost čokolada s različitim podrijetlom kakaovih zrna (Gana i Ekvador) i proizvedene na različiti način (vrijeme prženja zrna i končiranja čokoladne mase) na senzorskom panelu od 95 ispitivača. Kod čokolada podrijetlom iz Gane dugo vrijeme prženja smanjilo je prihvatljivost čokolada kod



većine ispitanika, dok za čokolade iz Ekvadora to nije uočeno. Također, za manji dio ispitanika, najprihvatljiviji uzorci tamne čokolade nisu bili povezani sa zemljopisnim podrijetlom kakaovih zrna i bili su povezani samo sa specifičnim kombinacijama prženja i končiranja, odnosno, preferirali su čokolade čija proizvodnja je uključivala kratko vrijeme prženja zrna i dugo vrijeme končiranja čokoladne mase ili dugo vrijeme prženja i kratko vrijeme končiranja. U istraživanju Lenfant i suradnika (2013), oblik komadića tamne čokolade utjecao je na percepciju teksture i okusa kod potrošača. Nadalje, u istraživanju Caponio i suradnika (2020), ručno proizvedena tamna čokolada postigla je bolji rezultat u slijepom testu od industrijski proizvedene tamne čokolade za miris, teksturu i okus. Također, pokazalo se da podaci navedeni na pakiranju tamne čokolade također utječu na očekivanja potrošača, prihvaćanje i namjeru kupnje (Torres-Moreno i sur., 2012b). Istraživanje je pokazalo da je nakon čitanja etikete i prije kušanja čokolade, na očekivanja potrošača uglavnom utjecala marka, dok je u testu slijepog kušanja najvažniji čimbenik bila vrsta čokolade pri čemu su čokolade s visokim udjelom kakaovih dijelova bile manje poželjne. Nakon kušanja proizvoda i čitanja etikete, prihvatljivost tamnih čokolada ponovno je ovisila o marki i vrsti proizvoda. Također, potrošači su imali veća očekivanja od *premium* čokolade u odnosu na čokoladu robne marke, ali obje su ocijenjene jednako prihvatljivima.

Senzorska analiza čokolada važna je za procjenu uspješnosti procesa formulacije visokokvalitetnih čokoladnih proizvoda koji zadovoljavaju preferencije potrošača. Kod čokolada, potrošačima su važni slatkoća, brzina taljenja, vizualni izgled pa čak i zvuk tijekom loma čokolade, općenito doživljavan kao parametar teksture, a neprihvatljivim smatraju gorčinu, pjeskovitost i prijanjanje čokolade tijekom konzumacije (Faccinnetto-Beltrán i sur., 2021; Harwood i Hayes, 2017). U ovome istraživanju, novoformuliranim čokoladama ocijenjeni su parametri izgleda (boja, sjaj i površina), akustičnosti (lom), teksture (taljenje), okusa (slatko, gorko i biljno) i opća prihvatljivost.

Uzorci pripremljeni prethodnom homogenizacijom inkapsulata u kakaovom maslacu (Č_SR2 i Č_L2) bili su općenito ocijenjeni višim ocjenama za vizualni izgled (boja, sjaj i površina) što može ukazati na njihovu bolju homogenizaciju u matriks čokolada ovim načinom pripreme. Zanimljivi su rezultati vezani uz lom, gdje je čokoladama s dodatkom liposomalnog inkapsulata (Č_L1 i Č_L2) određen viši intenzitet zvuka loma, ali ispitivanje tvrdoće čokolada (*poglavlje 4.10.4.*) ne prati ove rezultate. Bez obzira na visoki udjel kakaovih dijelova (65,5 %) u čokoladama, gorčina čokolada nije bila izražena (3,3 – 4,0). Također, biljni okus ekstrakta dobričice uspješno je „zamaskiran“ inkapsulacijom, ali i inkorporacijom u čokoladu, pošto je



biljni okus u svim uzorcima čokolada ocijenjen s vrlo niskim ocjenama (1,6 – 2,8). Sve čokolade bile su dobro prihvaćene od strane članova panela, a najvišu ocjenu za opću prihvatljivost dobio je uzorak Č_L1 kod kojeg je liposomalni inkapsulat dodan direktno u čokoladnu masu.

U radu Šeremet i suradnika (2023), čokoladne praline s punjenjem koje je sadržavalo 7,5 % vodenog ekstrakta dobričice, ocijenjene su visokim ocjenama opće prihvatljivosti (6 – 7) i izrazito niskim ocjenama za biljni okus (2 – 3) što znači da je čokolada zamaskirala okus ekstrakta dobričice. Važno je odabrati prikladan izvor i udjel polifenolnog ekstrakta koji se dodaje čokoladnim formulacijama kako bi se obogatio bioaktivni sastav, a pritom zadržala prihvatljivost proizvoda, s obzirom na izraženu gorčinu nekih polifenolnih spojeva. Tolve i suradnici (2018) objavili su da je udjel kakaovih dijelova u čokoladi (64, 72 i 85 %) pokazao značaj utjecaj na ujednačenost i intenzitet boje, gorčinu, slatkoću, trpkost, taljenje i ljepljivost čokolada, dok je dodatak inkapsulata fitosterola sušenog raspršivanjem (5, 10 i 15 %) utjecao jedino na parametre senzorske analize, dok su fizikalna svojstva (udjel vode, aktivitet vode, raspodjela veličine čestica i parametri boje) ostala nepromijenjena. Tako su čokolade s udjelom inkapsulata od 5 % bile bolje prihvaćene od onih s 10 i 15 % inkapsulata, a zanimljivo je istaknuti da su panelisti čokolade s inkapsulatima ocijenili višim ocjenama kada su bili upoznati sa sastavom čokolada, u usporedbi sa slijepim testovima. Schumacher i suradnici (2010) objavili su da je dodatak kvinoje u udjelu od 16 i 20 % u tamne čokolade rezultirao smanjenjem ukupnih polifenola, s oko 23 na oko 18 μmol pirokatehin g^{-1} uzorka, ali povećanjem udjela proteina i esencijalnih aminokiselina, uz visoke ocjene opće prihvatljivosti. Čokolade ne predstavljaju dobar matriks samo za isporuku polifenolnih spojeva, već i za ω -3-masne kiseline, probiotike, vitamine i mineralne tvari (Faccinnetto-Beltrán i sur., 2021).



6. Zaključci

1. Kemijski sastav uzoraka dobričice razlikovao se ovisno o prirodnom staništu, ali je u svim uzorcima određen visoki udjel netopljivih prehrambenih vlakana velike molekulske mase i proteina, nizak udjel ulja i visoki udjel kalcija i kalija.
2. Najzastupljeniji polifenolni spojevi dobričice bile su fenolne kiseline, točnije ružmarinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina i kriptoklorogenska kiselina, te flavonoid rutin.
3. *In vitro* ispitivanja na straničnim linijama probavnog sustava (CAL27, AGS, Caco-2 i HepG2) nisu pokazala citotoksično djelovanje vodenog ekstrakta dobričice u ispitivanim koncentracijama (0,0125, 0,025, 0,075 i 0,25 mg mL⁻¹) tijekom tretmana od 2 i 24 sata, ali je detektirano izraženo protektivno djelovanje na oksidacijska oštećenja modelnih makromolekula DNK i proteina, kao i bakteriostatsko djelovanje na patogene bakterije (*Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*).
4. *In vivo* ispitivanja vodenog ekstrakta dobričice (250, 500 i 1000 mg kg⁻¹) rezultirala su smanjenjem parametara oksidacijskog oštećenja DNK u krvi, bubrezima, slezeni i jetri Sprague Dawley štakora, kao i smanjenjem intenziteta peroksidacije lipida jetre i slezene.
5. Inkapsulacija vodenog ekstrakta dobričice sušenjem raspršivanjem, uz djelomično hidroliziranu guar gumu kao osnovu binarnog sustava nosača u kombinaciji s hidrolizatom kolagena, karboksimetil celulozom, mucinom, nutriziom i ksilanom, rezultirala je inkapsulatima visoke učinkovitosti zadržavanja polifenolnih spojeva dobričice, dok je njihovo kontrolirano i kontinuirano otpuštanje u uvjetima simulirane probave postignuto jedino inkorporacijom karboksimetil celuloze u sustav nosača.
6. Liposomalna inkapsulacija vodenog ekstrakta dobričice rezultirala je inkapsulatima poželjnih fizikalnih svojstava s visokom učinkovitošću zadržavanja polifenolnih spojeva dobričice i njihovim kontroliranim i kontinuiranim otpuštanjem u uvjetima simulirane probave u želucu i tankom crijevu.
7. Liposomalni inkapsulat ekstrakta dobričice u *in vivo* uvjetima pokazao je izraženije antioksidacijsko djelovanje na intenzitet peroksidacije lipida bubrega i jetre ženskih štakora, u odnosu na slobodni, neinkapsulirani oblik u istoj koncentraciji (250 mg kg⁻¹).



8. Dodatak obje vrste inkapsulata (sušen raspršivanjem i liposomalni) u čokolade rezultirao je bogatijim i raznovrsnijim bioaktivnim sastavom čokolada uz zadržavanje poželjnog profila taljenja čokolada, kao i njihovih izrazito prihvatljivih teksturalnih i reoloških svojstava te atraktivnijih senzorskih svojstava u odnosu na čokolade bez dodatka inkapsulata.



7. Literatura

- Abd El-Hack, M.E., Abdelnour, S.A., Taha, A.E., Khafaga, A.F., Arif, M., Ayasan, T., Swelum, A.A., Abukhalil, M.H., Alkahtani, S., Aleya, L., Abdel-Daim, M.M. (2019) Herbs as thermoregulatory agents in poultry: An overview. *Science of the Total Environment* **703**, 134399.
- Abedini, A., Dakhili, S., Bazzaz, S., Moghaddam, S.K., Mahmoudzadeh, M., Andishmand, H. (2023) Fortification of chocolates with high-value-added plant-based substances: Recent trends, current challenges, and future prospects. *Food Science & Nutrition* **11**, 3686-3705.
- Abedini, A., Roumy, V., Mahieux, S., Biabiany, M., Standaert-Vitse, A., Rivière, C., Sahpaz, S., Bailleul, F., Neut, C., Hennebelle, T. (2013) Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, 604536.
- Aeschlimann, J.M., Beckett, S.T. (2000) International inter-laboratory trials to determine the factors affecting the measurement of chocolate viscosity. *Journal of Texture Studies* **31**, 541-576.
- Afoakwa, E.O. (2016) *Chocolate Science and Technology*, 2.izd., Wiley Blackwell, Oxford.
- Afoakwa, E.O., Peterson, A., Fowler, M. (2007) Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - A review. *Trends in Food Science & Technology* **18**, 290-298.
- Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A., Ohene, E., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A., Fowler, M., Ryan, A. (2008) Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**, 840-857.
- Ahmadi, E., Elhamirad, A.H., Mollania, N., Asl, M.R.S., Pedramnia, A. (2022) Incorporation of white tea extract in nano-liposomes: Optimization, characterization, and stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **102**, 2050-2060.
- Ahmed, H.M. (2023) Ethnopharmacology of medicinal plants used in choman community, Hewler (Erbil), Kurdistan Region, Iraq. *Genetic Resources and Crop Evolution* (objavljeno online 1. prosinca 2023.). doi: 10.1007/s10722-023-01800-8.



- Alagawany, M., Abd El-Hack, M.E., Farag, M.R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y.S., Dhama, K. (2017) Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews* **18**, 167-176.
- Alañón, M.E., Castle, S.M., Siswanto, P.J., Cifuentes-Gómez, T., Spencer, J.P.E. (2016) Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. *Food Chemistry* **208**, 177-184.
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Ukaegbu, C.I. (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science* **4**, 200-214.
- Ali, N., Rashid, S., Nafees, S., Hasan, S.K., Shahid, A., Majed, F., Sultana, S. (2017) Protective effect of chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chemico-Biological Interactions* **272**, 80-91.
- Almeida, R.F., Gomes, M.H.G., Kurozawa, L.E. (2023) Rice bran protein increases the retention of anthocyanins by acting as an encapsulating agent in the spray drying of grape juice. *Food Research International* **172**, 113237.
- Altaf, M.M., Khan, M.S.A., Ahmad, I. (2019) Diversity of bioactive compounds and their therapeutic potential. U: *New Look to Phytomedicine* (Khan, M.S.A., Ahmad, I., Chattopadhyaj, D., ured.), Academic Press, New York, str. 15-34.
- Álvarez, C., Pando, D. (2021) Encapsulation technologies applied to food processing. U: *Food Formulation: Novel Ingredients and Processing Techniques* (Pathania, S., Tiwari, B.K., ured.), John Wiley & Sons Ltd., str. 121-145.
- Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., Roufegarinejad, L. (2018) Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry* **256**, 156-162.
- Amna, O.F., Nooraain, H., Noriham, A., Azizah, A.H., Husna, R.N. (2013) Acute and oral subacute toxicity study of ethanolic extract of *Cosmos Caudatus* leaf in Sprague Dawley rats. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* **3**, 301-305.
- An, H.J., Jeong, H.J., Um, J.Y., Kim, H.M., Hong, S.H. (2006) *Glechoma hederacea* inhibits inflammatory mediator release in IFN- γ and LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* **106**, 418-424.



- Anonymous 1, Croatian flora, <<https://botanickivrt.biol.pmf.hr/en/croatian-flora/>>. Pristupljeno 31. siječnja 2023.
- Anonymous 2, Tko su deset najvećih hrvatskih proizvođača ljekovitog bilja? <<https://www.agroklub.com/hortikultura/tko-su-deset-najvecih-hrvatskih-proizvodaca-ljekovitog-bilja/66971/>>. Pristupljeno 29. veljače 2024.
- Anonymous 3, Pharma Evers, <<https://www.pharmaevers.de/en/hitrechol/>>. Pristupljeno 20. siječnja 2024.
- Anonymous 4, TasteTech, <<https://www.tastetech.com/>>. Pristupljeno 15. ožujka 2024.
- Anonymous 5, Balchem, <<https://balchem.com/>>. Pristupljeno 15. ožujka 2024.
- Anonymous 6, Inovia, <<https://www.inovia.at/index.php/en/>>. Pristupljeno 15. ožujka 2024.
- Anonymous 7, Lycored, <<https://www.lycored.com/>>. Pristupljeno 15. ožujka 2024.
- Anonymous 8, Fine Flavour Cocoa, <<https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/>>. Pristupljeno 16. ožujka 2024.
- Anonymous 9, Understanding chocolate certifications, <<https://shelachocodiary.com/understanding-chocolate-certifications/>>. Pristupljeno 13. ožujka 2024.
- Anonymous 10, ICCO, <<https://www.icco.org/who-we-are/#vision>>. Pristupljeno 13. ožujka 2024.
- Anonymous 11, WCF, <<https://worldcocoafoundation.org/about#vision-and-mission-and-looking-forward-34>>. Pristupljeno 13. ožujka 2024.
- Anonymous 12, Exploring the future of chocolate: Trends, innovations, and sustainability, <<https://cascadechocolatecompany.com/blogs/posts/exploring-the-future-of-chocolate-trends-innovations-and-sustainability>>. Pristupljeno 28. veljače 2024.
- Anonymous 13, New technology enhances chocolate production, <<https://in-confectionery.com/new-technology-enhances-chocolate-production/>>. Pristupljeno 17. ožujka 2024.
- Anonymous 14, The hottest chocolate trends for 2024, <<https://www.tastetomorrow.com/inspiration/The-3-hottest-chocolate-trends-for-2024>>. Pristupljeno 17. ožujka 2024.



- Anonymous 15, Flavor frenzy: A look at the hottest flavors in chocolate confectionery in 2024, <<https://www.lukerchocolate.com/en/chocolate-and-portfolio/hottest-flavors-in-chocolate-confectionery-in-2024/>>. Pristupljeno 17. ožujka 2024.
- Araújo, C.S., Vimercati, W.C., Macedo, L.L., Saraiva, S.H., Teixeira, L.J.Q., Gomes da Costa, J.M., Pimenta, C.J. (2022) Encapsulation of phenolic and antioxidant compounds from spent coffee grounds using spray-drying and freeze-drying and characterization of dried powders. *Journal of Food Science* **87**, 4056-4067.
- Arruda, H.S., Pereira, G.A., de Moraes, D.R., Eberlin, M.N., Pastore, G.M. (2018) Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry* **245**, 738-749.
- Arruda, H.S., Pereira, G.A., Pastore, G.M. (2017) Optimization of extraction parameters of total phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) fruits using response surface methodology. *Food Analytical Methods* **10**, 100-110.
- Arumughan, W., Nypelo, T., Hasani, M., Brelid, H., Albertsson, S., Wagberg, L., Larsson, A. (2021) Specific ion effects in the adsorption of carboxymethyl cellulose on cellulose: The influence of industrially relevant divalent cations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **626**, 127006.
- Ashkezary, M.R., Yeganehzad, S., Vatankhah, H., Todaro, M.A., Maghsoudlou, Y. (2018) Effects of different emulsifiers and refining time on rheological and textural characteristics of compound chocolate. *Italian Journal of Food Science* **30**, 26-36.
- Assadpour, E., Jafari, S.M. (2019) Advances in spray-drying encapsulation of food bioactive ingredients: From microcapsules to nanocapsules. *Annual Review of Food Science and Technology* **10**, 103-131.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005) Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* **89**, 27-36.
- Augustin, M.A., Sanguansri, L., Bode, O. (2006) Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of Food Science* **71**, E25-E32.
- Azimova, S.S., Glushenkova, A.I., Vinogradova, V.I. (2012) *Glechoma hederacea* L., lipids, lipophilic components and essential oils from plant sources. *Journal of Ecology* **87**, 347-364.



- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**, 426-436.
- Babich, H., Schuck, A.G., Weisburg, J.H., Zuckerbraun, L. (2011) Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of Toxicology* **2011**, 467305.
- Bacanli, M., Aydın, S., Taner, G., Göktaş, H.G., Şahin, T., Başaran, A.A., Başaran, N. (2015) Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced oxidative damage in Wistar Albino rats? *Human & Experimental Toxicology* **35**, 877-886.
- Baena-Aristizáb, C.M., Foxwell, M., Wright, D., Villamizar-Rivero, L. (2019) Microencapsulation of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with guar gum: Preliminary approach using spray drying. *Journal of Biotechnology* **302**, 32-41.
- Baenas, N., Abellán, Á., Rivera, S., Moreno, D.A., García-Viguera, C., Domínguez-Perles, R. (2018) Foods and supplements. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (Galanakis, C.M., ured.), Woodhead Publishing, str. 327-362.
- Bagade, S.B., Patil, M. (2019) Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **51**, 138-149.
- Balanč, B., Trifković, K., Đorđević, V., Marković, S., Pjanović, R., Nedović, V., Bugarski, B. (2016) Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. *Food Hydrocolloids* **61**, 832-842.
- Balanč, B.D., Ota, A., Djordjević, V.B., Šentjurc, M., Nedović, V.A., Bugarski, B.M., Poklar Ulrih, N. (2015) Resveratrol-loaded liposomes: Interaction of resveratrol with phospholipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* **117**, 1615-1626.
- Balci-Torun, F. (2023) Encapsulation of *Origanum onites* essential oil with different wall material using spray drying. *Phytochemical Analysis* (objavljeno online 23. ožujka 2023.). doi: 10.1002/pca.3218.
- Bangham, A.D., Horne, R.W. (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* **8**, 660-668.



- Bansil, R., Turner, B.S. (2006) Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 164-170.
- Bao, H., Ding, H.H., Charles, A.P.R., Hui, D., Rakshit, S., Nahashon, S., Wu, Y. (2023) Application of yellow mustard mucilage in encapsulation of essential oils and polyphenols using spray drying. *Food Hydrocolloids* **143**, 108815.
- Baranauskaite, J., Duman, G., Corapcioglu, G., Baranauskas, A., Taralp, A., Ivanauskas, L., Bernatoniene, J. (2018) Liposomal incorporation to improve dissolution and stability of rosmarinic acid and carvacrol extracted from oregano (*O. onites* L.). *BioMed Research International* **2018**, 6147315.
- Barišić, V., Petrović, J., Lončarević, I., Flanjak, I., Šubarić, D., Babić, J., Miličević, B., Doko, K., Blažić, M., Ačkar, Đ. (2021) Physical properties of chocolates enriched with untreated cocoa bean shells treated with high-voltage electrical discharge. *Sustainability* **13**, 2620.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, C.F.R. (2011) From famine plants to tasty and fragrant spices: Three Lamiaceae of general dietary relevance in traditional cuisine of Trás-os-Montes (Portugal). *LWT - Food Science and Technology* **44**, 543-548.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, C.F.R. (2010) Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT – Food Science and Technology* **43**, 544-550.
- Baş, D., Boyacı, I.H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* **78**, 836-845.
- Bate-Smith, E.C., Swain, T. (1962) Flavonoid compounds. U: *Comparative Biochemistry* (Mason, H.S., Florkin, A.M., ured.), Academic Press, New York, str. 755-809.
- Batinić, P.M., Đorđević, V.B., Stevanović, S.I., Balanč, B.D., Marković, S.B., Luković, N.D., Mijin, D.Ž., Bugarski, B.M. (2020) Formulation and characterization of novel liposomes containing histidine for encapsulation of a poorly soluble vitamin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **59**, 101920.
- Bayir, H. (2005) Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* **33**, S498-S501.
- BBC (2024) Chocolate: Cocoa price hits record high as El Niño hurts crops, <<https://www.bbc.com/news/business-68248145>>. Pristupljeno 25. veljače 2024.



- Bhandari, B.R., Kamlesh, C.P., Chen, X.D. (2008) Spray drying of food materials – process and product characteristics. U: *Drying Technologies in Food Processing* (Chen, X.D., Mujumdar, A.S., ured.), Wiley-Blackwell, str. 113-159.
- Beg, M.S., Ahmad, S., Jan, K., Bashir, K. (2017) Status, supply chain and processing of cocoa – A review. *Trends in Food Science & Technology* **66**, 108-116.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Bušić, A., Franekić, J., Komes, D. (2014) Phytochemical attributes of four conventionally extracted medicinal plants and cytotoxic evaluation of their extracts on human laryngeal carcinoma (HEp2) cells. *Journal of Medicinal Food* **17**, 206-2017.
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International* **44**, 1094-1101.
- BeMiller, J.N. (2019) Cellulose and cellulose-based hydrocolloids. U: *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, 3. izd. (BeMiller, J.N., ured.), Woodhead Publishing, 223-240.
- Berendika, M., Domjanić Drozdek, S., Odeh, D., Oršolić, N., Dragičević, P., Sokolović, M., Elez Garofulić, I., Đikić, D., Landeka Jurčević, I. (2022) Beneficial effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) and myrtle (*Myrtus communis* L.) extract on rat health. *Molecules* **27**, 581.
- 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.
- Bhandari, B.R., Datta, N., Howes, T. (1997) Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology* **15**, 671-684.
- Bisceglie, V. (1934) Über die antineoplastische Immunität. *Zeitschrift für Krebsforschung* **40**, 122-140.
- Bitwell, C., Indra, S.S., Luke, C., Kakoma, M.K. (2023) A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African* **19**, e01585.



- Boegh, M., Nielsen, H.M. (2015) Mucus as a barrier to drug delivery – Understanding and mimicking the barrier properties. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **116**, 179-186.
- Boel, E., Koekoekx, R., Dedroog, S., Babkin, I., Vetrano, M.R., Clasen, C., Van den Mooter, G. (2020) Unraveling particle formation: From single droplet drying to spray drying and electrospraying. *Pharmaceutics* **12**, 625.
- Bolenz, S., Holm, M., Langkrär, C. (2014) Improving particle size distribution and flow properties of milk chocolate produced by ball mill and blending. *European Food Research and Technology* **238**, 139-147.
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Leone, G., Consumi, M., Rossi, C., Lamponi, S., Magnani, A. (2018) Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry* **233**, 55-63.
- Bozzuto, G., Molinari, A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine* **10**, 975-999.
- Bölek, S., Tosya, F., Akçura, S. (2022) Effects of *Santolina chamaecyparissus* essential oil on rheological, thermal and antioxidative properties of dark chocolate. *International Journal of Gastronomy and Food Science* **27**, 100481.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 25-30.
- Bryła, A., Lewandowicz, G., Juzwa, W. (2015) Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering* **167**, 189-195.
- Bunn, C. Lundy, M., Läderach, P., Castro, F. (2018) Global climate change impacts on cocoa. *International Symposium on Cocoa Research (ISCR)*, Lima, Peru, CABI Record Number: 20203127118.
- Bustamante, D.E., Motilal, L.A., Calderon, M.S., Mahabir, A., Oliva, M. (2022) Genetic diversity and population structure of fine aroma cacao (*Theobroma cacao* L.) from north Peru revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Frontiers in Ecology and Evolution* **10**, 895056.
- Cacan, E., Kokten, K., Kilic, O. (2018) Leaf fatty acid composition of some Lamiaceae taxa from Turkey. *Frontiers in Nutrition* **20**, 231-236.
- Calva-Estrada, S.J., Utrilla-Vázquez, M., Vallejo-Cardona, A., Roblero-Pérez, D.B., Lugo Cervantes, E. (2020) Thermal properties and volatile compounds profile of commercial



- dark-chocolates from different genotypes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from Latin America. *Food Research International* **136**, 109594.
- Campbell, F., Bos, F.L., Sieber, S., Arias-Alpizar, G., Koch, B.E., Huwyler, J., Kros, A., Bussmann, J. (2018) Directing nanoparticle biodistribution through evasion and exploitation of Stab2-dependent nanoparticle uptake. *ACS Nano* **12**, 2138-2150.
- Caponio, G. R., Lorusso, M.P., Sorrenti G.T., Marcotrigiano, V., Difonzo, G., De Angelis, E., Guagnano, R., Ciaula, A.D., Diella, G., Logrieco, A.F., Montagna, M.R., Monaci, L., De Angelis, M., Portincasa, P. (2020) Chemical characterization, gastrointestinal motility and sensory evaluation of dark chocolate: A nutraceutical boosting consumers' health. *Nutrients* **12**, 939.
- Carr, R.L. (1965) Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering* **72**, 163-168.
- Carlson, W.A., Ziegenfuss, E.M., Overton, J.D. (1962) Compatibility and manipulation of guar gum. *Food Technology* **16**, 50-54.
- Castro-López, C., Espinoza-González, C., Ramos-González, R., Boone-Villa, V.D., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, G.C.G., Aguilar, C.N., Ventura-Sobrevilla, J.M. (2021) Spray-drying encapsulation of microwave-assisted extracted polyphenols from *Moringa oleifera*: Influence of tragacanth, locust bean, and carboxymethyl-cellulose formulations. *Food Research International* **144**, 110291.
- Catalán, V., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J. (2018) Inflammatory and oxidative stress markers in skeletal muscle of obese subjects. U: *Obesity* (Marti del Moral, A., García, C.M.A., ured.), Academic Press, New York, str. 163-189.
- CBI (2022) What is the demand for cocoa on the European market? <<https://www.cbi.eu/market-information/cocoa/what-demand>>. Pristupljeno 26. veljače 2024.
- Celi, P., Gabai, G. (2015) Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Frontiers in Veterinary Science* **2**, 48.
- Chang, T.M. (1964) Semipermeable microcapsules. *Science* **146**, 524-525.
- Chao, W.W., Chan, W.C., Ma, H.T., Chou, S.Z. (2021a) Phenolic acids and flavonoids-rich *Glechoma hederacea* L. (Lamiaceae) water extract against H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Food Biochemistry* **46**, e14032.



- Chao, W.W., Liou, Y.J., Ma, H.T., Chen, Y.H., Chou, S.T. (2021b) Phytochemical composition and bioactive effects of ethyl acetate fraction extract (EAFE) of *Glechoma hederacea* L. *Journal of Food Biochemistry* **45**, e13815.
- Chen, B., Wang, X., Lin, D., Xu, D., Li, S., Huang, J., Weng, S., Lin, Z., Zheng, Y., Yao, H., Lin, X. (2019) Proliposomes for oral delivery of total bioflavonoids extract from *Selaginella doederleinii*: Formulation development, optimization, and *in vitro*–*in vivo* characterization. *International Journal of Nanomedicine* **14**, 6691-6706.
- Chen, H., Dai, H., Zhu, H., Ma, L., Fu, Y., Feng, X., Sun, Y., Zhang, Y. (2022) Construction of dual-compartmental micro-droplet via shrimp ferritin nanocages stabilized Pickering emulsions for co-encapsulation of hydrophobic/hydrophilic bioactive compounds. *Food Hydrocolloids* **126**, 107443.
- Chen, L., Cao, H., Xiao, J. (2018) Polyphenols: Absorption, bioavailability, and metabolomics. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (Galanakis, C.M., ured.), Woodhead Publishing, str. 45-67.
- Chen, X., Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Lu, Q. (2015) Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food & Function* **6**, 927-931.
- Cheng, Y., Xue, F., Yu, S., Du, S., Yang, Y. (2021) Subcritical water extraction of natural products. *Molecules* **26**, 4004.
- Chino, X.M.S., Ríos, L.J.C., Herrera, J.M., Martínez, A.C., Martínez, C.J. (2019) Effect of thermal treatment on the extraction efficiency, physicochemical quality of *Jatropha curcas* oil, and biological quality of its proteins. *Journal of Food Science and Technology* **56**, 1567-1574.
- Chou, S.T., Chan, Y.R., Chung, Y.C. (2012) Studies on the antimutagenicity and antioxidant activity of the hot water extract of *Glechoma hederacea*. *Journal of Food and Drug Analysis* **20**, 637-645.
- Chou, S.T., Ho, B.Y., Tai Y.T., Huang, C.J., Chao, W.W. (2020) Bidirect effects from cisplatin combine with rosmarinic acid (RA) or hot water extracts of *Glechoma hederacea* (HWG) on renal cancer cells. *Chinese Medicine* **15**, 77.
- Chou, S.T., Lai, C.C., Lai, C.P., Chao, W.W. (2018) Chemical composition, antioxidant, anti-melanogenic and anti-inflammatory activities of *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* **122**, 675-685.



- Chou, S.T., Lin, T.H., Peng, H.Y., Chao, W.W. (2019) Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Life Sciences* **231**, 116519.
- Chung, Y.C., Liao, J.W., Li, K.Y., Jhan, J.K., Chou, S.T. (2020) *In vivo* toxicity and the antioxidant activity of the hot water extract of *Glechoma hederacea*. *Research Square* (predtisak), doi: 10.21203/rs.3.rs-42365/v1.
- Cinquanta, L., Cesare, C.D., Manoni, R., Piano, A., Roberti, P., Salvatori, G. (2016) Mineral essential elements for nutrition in different chocolate products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **67**, 773-778.
- Clarke, R.J. (2003) Coffee-instant. U: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Caballero, B., Trugo, L.C., Finglas, P.M., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 1493-1498.
- Coelho, S.C., Estevinho, B.N., Rocha, F. (2021) Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying – A review. *Food Chemistry* **339**, 127850.
- Coelho, V.R., Vieira, C.G., Pereira de Souza, L., Moysés, F., Basso, C., Papke, D.K.M., Pires, T.R., Siqueira, I.R., Picada, J.N., Pereira, P. (2015) Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarini acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sciences* **122**, 65-71.
- Coherent Market Insights (2022) Polyphenol market, by source (grapes, green tea, cocoa, berries, other sources), by application (functional foods, dietary supplements, beverages, other application), by geography (North America, Latin America, Europe, Asia Pacific, Middle East & Africa) – Size, share, outlook, and opportunity analysis, 2022 – 2030, <<https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/polyphenol-market-5299>> Pristupljeno 9. ožujka 2023.
- Coimbra, P.P.S., Cardoso, F.S.N., Gonçalves, É.C.B.A. (2020) Spray-drying wall materials: relationship with bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **61**, 2809-2826.
- Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* **26**, 249-261.



- Coss, E., Kealey, C., Brady, D., Walsh, P. (2018) A laboratory investigation of the antimicrobial activity of a selection of western phytomedicinal tinctures. *European Journal of Integrative Medicine* **19**, 80-83.
- Dejeu, I.L., Vicaș, L.G., Jurca, T., Teușdea, A.C., Mureșan, M.E., Fritea, L., Svera, P., Gabor, G.A., Dejeu, G.E., Maghiar, O.A., Bodea, A.S., Pallag, A., Marian, E. (2021) Liposomes with caffeic acid: Morphological and structural characterisation, their properties and stability in time. *Processes* **9**, 912.
- Delwatta, S.L., Gunatilake, M., Baumans, V., Seneviratne, M.D., Dissanayaka, M.L.B., Batagoda, S.S., Udagedara, A.H., Walpola, P.B. (2018) Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. *Animal Models and Experimental Medicine* **1**, 250-254.
- De Oliveira, N.C.D., Sarmiento, M.S., Nunes, E.A., Porto, C.M., Rosa, D.P., Bona, S.R., Rodrigues, G., Marroni, N.P., Pereira, P., Picada, J.N., Ferraz, A.B.F., Thiesen, F.V., Da Silva, J. (2012) Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and Chemical Toxicology* **50**, 1208-1214.
- del Baño, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J.A., Ortuño, A., Quirin, K.W., Gerard, D. (2003) Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4247-4253.
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., Maji, T.K. (2017) Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science* **239**, 136–145.
- Di, L., Kerns, E.H. (2016) Formulation. U: *Drug-Like Properties*, 2. izd. (Di, L., Kerns, E.H., ured.), Academic Press, str. 497-510.
- Dias, D.R., Botrel, D.A., Fernandes, R.V.D.B., Borges, S.V. (2017) Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science* **13**, 31-37.
- Didar, Z. (2020) Characterization of white chocolate enriched with free or encapsulated pomegranate extract. *Journal of Nutrition Fasting and Health* **8**, 302-309.
- Didar, Z. (2021) Enrichment of dark chocolate with vitamin D3 (free or liposome) and assessment quality parameters. *Journal of Food Science and Technology* **58**, 3065-3072.



- Dizdaroglu, M., Jaruga, P. (2012) Mechanisms of free radical induced damage to DNA. *Free Radical Research* **46**, 382–419.
- Dolatowska-Żebrowska, K., Ostrowska-Ligeża, E., Wirkowska-Wojdyła, M., Bryś, J., Górska, A. (2019) Characterization of thermal properties of goat milk fat and goat milk chocolate by using DSC, PDSC and TGA methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **138**, 2769-2779.
- Domene-López, D., García-Quesada, J.C., Martín-Gullon, I., Montalbán, M.G. (2019) Influence of starch composition and molecular weight on physicochemical properties of biodegradable films. *Polymers* **11**, 1084.
- Döring, A.S., Petersen, M. (2014) Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochemistry Letters* **718**, 1-7.
- Du, Y., Guo, H., Lou, H. (2007) Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1695-1701.
- Duhan, N., Sahu, J.K., Mohapatra, A., Naik, S.N. (2021) Microencapsulation of ghee flavorants with whey protein concentrate and guar gum using spray drying. *Journal of Food Processing and Preservation* **45**, e15537.
- Dzelagha, B.F., Ngwa, N.M., Bup, D.N. (2020) A review of cocoa drying technologies and the effect on bean quality parameters. *International Journal of Food Science* **2020**, 830127.
- El-Aasr, M., Nohara, T., Ikeda, T., Abu-Risha, S.E., Elekhawy, E., Tawfik, H.O., Shoeib, N., Attia, G. (2023) LC-MS/MS metabolomics profiling of *Glechoma hederacea* L. methanolic extract; *in vitro* antimicrobial and *in vivo* with *in silico* wound healing studies on *Staphylococcus aureus* infected rat skin wound. *Natural Product Research* **37**, 1730-1734.
- El-Sayed, S., Mahmoud, K.H., Fatah, A.A., Hassen, A. (2011) DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends. *Physica B: Condensed Matter* **406**, 4068-4076.
- Elversson, J., Millqvist-Fureby, A. (2005) Particle size and density in spray drying – effects of carbohydrate properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94**, 2049-2060.



- Erami, S.R., Amiri, Z.R., Jafari, S.M. (2019) Nanoliposomal encapsulation of bitter Gourd (*Momordica charantia*) fruit extract as a rich source of health-promoting bioactive compounds. *LWT - Food Science and Technology* **116**, 108581.
- Escobar-Avello, D., Avendaño-Godoy, J., Santos, J., Lozano-Casatellón, J., Mardones, C., von Baer, D., Luengo, J., Lamuela-Raventós, R.M., Vallverdú-Queralt, A., Gómez-Gaete, C. (2021) Encapsulation of phenolic compounds from a grape cane pilot-plant extract in hydroxypropyl beta-cyclodextrin and maltodextrin by spray drying. *Antioxidants* **10**, 1130.
- Eskandari, M., Moghadam, B.H., Bagheri, R., Ashtary-Larky, D., Eskandari, E., Nordvall, M., Dutheil, F., Wong, A. (2020) Effects of interval jump rope exercise combined with dark chocolate supplementation on inflammatory adipokine, cytokine concentrations, and body composition in obese adolescent boys. *Nutrients* **12**, 3011.
- Espinosa-Andrews, H., Morales-Hernandez, N., García-Márquez, E., Rodríguez-Rodríguez, R. (2023) Development of fish oil microcapsules by spray drying using mesquite gum and chitosan as wall materials: Physicochemical properties, microstructure, and lipid hydroperoxide concentration. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **72**, 646-655.
- Esposito, T., Mencherini, T., Del Gaudio, P., Auriemma, G., Franceschelli, S., Picerno, P., Aquino, R.P., Sansone, F. (2020) Design and development of spray-dried microsystems to improve technological and functional properties of bioactive compounds from hazelnut shells. *Molecules* **25**, 1273.
- Eun, J.B., Maruf, A., Das, P.R., Nam, S.H. (2020) A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze-drying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60**, 3547-3572.
- Faccinnetto-Beltrán, P., Gómez-Fernández, A.R., Santacruz, A., Jacobo-Velázquez, D.A. (2021) Chocolate as carrier to deliver bioactive ingredients: Current advances and future perspectives. *Foods* **10**, 2065.
- Fadel, O., Kirat, K.E., Morandat, S. (2011) The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation *in situ*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* **1808**, 2973-2980.



- Fadilah, M.A.N., Saputro, A.D., Bangun, S.K., Setiowati, A.D., Rahayoe, S., Karyadi, J.N.W. (2021) Increasing the melting temperature of chocolate by adding xanthan gum-based hydrogel: A preliminary study. *Advances in Biological Sciences Research* **19**, 174-179.
- Fang, N., Yu, S., Prior, R.L. (2002) LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plumps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3579-358.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology* **21**, 510-523.
- Farr, S.A., Niehoff, M.L., Ceddia, M.A., Herrlinger, K.A., Lewis, B.J., Feng, S., Welleford, A., Butterfield, D.A., Morley, J.E. (2016) Effect of botanical extracts containing carnosic acid or rosmarinic acid on learning and memory in SAMP8 mice. *Physiology & Behavior* **165**, 328-338.
- Feng, Y., Niu, L., Sun, C., Tu, J., Yu, L., Xiao, J. (2023) Collagen hydrolysates improve the efficiency of sodium alginate-encapsulated tea polyphenols in beads and the storage stability after commercial sterilization. *International Journal of Biological Macromolecules* **231**, 123314.
- Feng, Y., Sun, C., Yuan, Y., Zhu, Y., Wan, Y., Firemong, C.K., Omari-Siaw, E., Xu, Y., Pu, Z., Yu, J., Xu, X. (2016) Enhanced oral bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation. *International Journal of Pharmaceutics* **501**, 342-249.
- Ferreira, S.L., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N. (2007) Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* **597**, 179-186.
- Frauendorfer, F., Schieberle, P. (2008) Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 10244-10251.
- Frías, M.A., Díaz, S.B., Ale, N.M., Altabef, B., Disalvo, E.A. (2006) FTIR analysis of the interaction of arbutin with dimyristoyl phosphatidylcholine in anhydrous and hydrated states. *BBA-Biomembranes* **1758**, 1823-1829.
- Funabiki, R., Takeshita, K., Miura, Y., Shibasato, M., Nagasawa, T. (1999) Dietary supplement of G-rutin reduces oxidative damage in the rodent model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1078-1082.



- Future Market Insights (2023) Food encapsulation market outlook (2023 to 2033), <<https://www.futuremarketinsights.com/reports/food-encapsulation-market>>. Pristupljeno 15. ožujka 2024.
- GAIN (2016) Consumer food-patterns of food expenditures and imports in Croatia, USDA Foreign Agricultural Service, GAIN Report Number: HR1602.
- Gajdoš Kljusurić, J., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva, M., Djaković, S., Kurtanjek, Ž. (2016) NIR analysis of berry fruit extracts. *Food Technology and Biotechnology* **54**, 236-242.
- Galati, G., Chan, T., Wu, B., O'Brien, P.J. (1999) Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology* **12**, 521-525.
- Garcia de Figueiredo-Rinhel, A.S., Fernandes de Andrade, M., Landi-Librandi, A.P., Azzolini, A.E.C.S., Kabeya, L.M., Bastos, J.K., Lucisano-Vali Y.M. (2019) Incorporation of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) leaf extract into phosphatidylcholine-cholesterol liposomes improves its anti-inflammatory effect *in vivo*. *Natural Product Research* **33**, 2521-2525.
- García-Gurrola, A., Rincón, S., Escobar-Puentes, A.A., Zepeda, A., Martínez-Bustos, F. (2019) Microencapsulation of red sorghum phenolic compounds with esterified sorghum starch as encapsulant materials by spray drying. *Food Technology & Biotechnology* **57**, 341-349.
- Garcia-Yu, I., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M.A., Rodriguez-Sanchez, E., Mora-Simon, S., Maderuelo-Fernandez, J.A., Recio-Rodriguez, J.I. (2022) Effects of cocoa-rich chocolate on cognitive performance in postmenopausal women. A randomised clinical trial. *Nutritional Neuroscience* **25**, 1147-1158.
- Gato, E., Rosalowska, A., Martínez-Gutián, M., Lores, M., Bou, G., Pérez, A. (2020) Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **132**, 110885.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalinić, V. (2014) *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: A correlation study. *Food Technology and Biotechnology* **52**, 119-127.



- George, A., Shah, P.A., Shrivastav, P.S. (2019) Guar gum: Versatile natural polymer for drug delivery applications. *European Polymer Journal* **112**, 722-735.
- Gerard, J. (1964) *Gerard's Herball: The Esses thereof distilled by Marcus Woodward (1927) from the edition of T.H. Johnson (1636)*, Houghton Mifflin Co., Boston, SAD.
- Ghalehkandi, J.G., Ebrahimnezhad, Y., Nobar, R.S. (2012) Effect of garlic (*Allium sativum*) aqueous extract on serum values of urea, uric-acid and creatinine compared with chromium chloride in male rats. *Annals of Biological Research* **3**, 4485-4490.
- Ghazani, S.M., Marangoni, A.G. (2021) Molecular origins of polymorphism in cocoa butter. *Annual Review of Food Science and Technology* **12**, 567-590.
- Gilbert-López, B., Plaza, M., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Herrero, M. (2017) Subcritical water extraction and neof ormation of antioxidants. U: *Water Extraction of Bioactive Compounds* (Dominguez, H., Gonzalez Munoz, M., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 109-130.
- Glicerina, V., Balestra, F., Rosa, M.D., Romani, S. (2013) Rheological, textural and calorimetric modifications of dark chocolate during process. *Journal of Food Engineering* **119**, 173-179.
- Glicerina, V., Balestra, F., Rosa, M.D., Romani, S. (2016) Microstructural and rheological characteristics of dark, milk and white chocolate: A comparative study. *Journal of Food Engineering* **169**, 165-171.
- González-Cruz, E.M., Calderón-Santoyo, M., Barros-Castillo, J.C., Ragazzo-Sánchez, J.A. (2021) Evaluation of biopolymers in the encapsulation by electrospraying of polyphenolic compounds extracted from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) variety Biloxi. *Polymer Bulletin* **78**, 3561-3576.
- González-Ortega, R., Šturm, L., Skrt, M., Di Mattia, C.D., Pittia, P., Poklar Ulrih, N. (2021) Liposomal encapsulation of oleuropein and an olive leaf extract: Molecular interactions, antioxidant effects and applications in model food system. *Food Biophysics* **16**, 84-97.
- Grabowska, K., Amanowicz, K., Paško, P., Podolak, I., Galanty, A. (2022) Optimization of the extraction procedure for the phenolic-rich *Glechoma hederacea* L. herb and evaluation of its cytotoxic and antioxidant potential. *Plants* **11**, 2217.
- Granata, G., Consoli, G.M.L., Lo Nigro, R., Geraci, C. (2018) Hydroxycinnamic acids loaded in lipid-core nanocapsules. *Food Chemistry* **245**, 551-556.



- Granato, D., Barba, F.J., Bursać Kovačević, D., Morenzo, J.M., Cruz, A.G., Putnik, P. (2020) Functional food: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annual Review of Food Science and Technology* **11**, 93-118.
- Granato, D., Nunes, D.S., Barba, F.J. (2017) An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology* **62**, 13-22.
- Grassia, M., Salvatori, G., Roberti, M., Planeta, D., Cinquanta, L. (2019) Polyphenols, methylxanthines, fatty acids and minerals in cocoa beans and cocoa products. *Journal of Food Measurement and Characterization* **13**, 1721-1728.
- Green, B.K., Schleicher, L. (1957) Oil-containing microscopic capsules and method of making. US patent US 2 800 457.
- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Bucić-Kojić, A. (2020) Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants* **9**, 923.
- Grlić, Lj. (1990) *Enciklopedija Samoniklog Jestivog Bilja*, Zagreb, August Cesarec Zagreb.
- Grlić, Lj. (2005) *Enciklopedija Samoniklog Jestivog Bilja*, 3. izd., Ex Libris, Rijeka.
- Grosso, G., Stepaniak, U., Topor-Madry, R., Szafraniec, K., Pajak, A. (2014) Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition* **30**, 1398-1403.
- Gubitosi, M., Nosrati, P., Hamid, M.K., Kuczera, S., Behrens, M.A., Johansson, E.G., Olsson, U. (2017) Stable, metastable and unstable cellulose solutions. *Royal Society Open Science* **4**, 170487.
- Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., Nogueira, E. (2021) Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics* **601**, 120571.
- Gültekin-Özgülven, M., Berktaş, İ., Özçelik, B. (2016) Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology* **66**, 252-259.



- Gürbüz, E., Keresteci, B., Günneç, C., Baysal, G. (2020) Encapsulation applications and production techniques in the food industry. *Journal of Nutrition and Health Sciences* **7**, 1-6.
- Gwiazdowska, D., Uwineta, P.A., Frak, S., Ju, K., Marchwinska, K., Gwiazdowski, R., Waskiewicz, A. (2022) Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm properties of *Glechoma hederacea* extracts obtained by supercritical fluid extraction, using different extraction conditions. *Applied Sciences* **12**, 3572.
- Halahlah, A., Räikkönen, H., Piironen, V., Valoppi, F., Mikkonen, K.S., Ho, T.M. (2023) Wood hemicelluloses as sustainable wall materials to protect bioactive compounds during spray drying of bilberries. *Powder Technology* **415**, 118148.
- Halliwel, B. (2000) Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *The American Journal of Clinical Nutrition* **72**, 1082-1087.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4. izd., Oxford University Press, New York.
- Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V., Peralta, R.M. (2012) Phenolic compounds in fruits – An overview. *International Journal of Food Science and Technology* **47**, 2023-2044.
- Hammami, C., René, F. (1997) Determination of freeze-drying process variables for strawberries. *Journal of Food Engineering* **32**, 133-154.
- Hanachi, A., Bianchi, A., Kahn, C.J.F., Velot, E., Arab-Tehrany, E., Cakir-Kiefer, C., Linder, M. (2022) Encapsulation of salmon peptides in marine liposomes: Physico-chemical properties, antiradical activities and biocompatibility assays. *Marine Drugs* **20**, 249.
- Harwood, M.L., Hayes, J.E. (2017) Sensory evaluation of chocolate and cocoa products. U: *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use* (Beckett, S.T., Fowler, M.S., Ziegler, G.R., ured.), John Wiley & Sons, 509-520.
- Haslam, E., Cai, Y. (1994) Plant polyphenols (vegetable tannins) - gallic acid metabolism. *Natural Product Report* **11**, 41-66.
- Hatfield, A.W. (1971) *How to Enjoy Your Weeds*, Sterling Publishing Co., New York, SAD.
- Hausner, H.H. (1967) Friction conditions in a mass of metal powder. *International Journal of Powder Metallurgy* **3**, 7-13.



- Hayashi, Y., Takamiya, M., Jensen, P.B., Ojea-Jiménez, I., Claude, H., Antony, C., Kjaer-Sorensen, K., Grabher, C., Boesen, T., Gilliland, D., Oxvig, C., Strähle, U., Carsten, W. (2020) Differential nanoparticle sequestration by macrophages and scavenger endothelial cells visualized *in vivo* in real-time and at ultrastructural resolution. *ACS Nano* **14**, 1665-1681.
- Henry, D.Y., Gueritte-Voegelein, F., Insel, P.A., Ferry, N., Bouguet, J., Potier, P., Sevenet, T., Hanoune, J. (1987) Isolation and characterization of 9-hydroxy-10-*trans*,12-*cis*-octadecadienoic acid, a novel regulator of platelet adenylate cyclase from *Glechoma hederacea* L. Labiatae. *European Journal of Biochemistry* **170**, 389-394.
- Hettrich, K., Drechsler, U., Loth, F., Volkert, B. (2017) Preparation and characterization of water-soluble xylan ethers. *Polymers* **9**, 129.
- Higaki, K., Ueno, S., Koyano, T., Sato, K. (2001) Effect of ultrasonic irradiation on crystallization behavior of tripalmitoylglycerol and cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists` Society* **78**, 513-518.
- Hinneh, M., Van de Walle, D., Haeck, J., Abotsi, E.E., De Winne, A., Saputro, A.D., Messens, K., Van Durme, J., Afoakwa, E.O., De Cooman, L., Dewettinck, K. (2019) Applicability of the melanger for chocolate refining and Stephan mixer for conching as small-scale alternative chocolate production techniques. *Journal of Food Engineering* **253**, 59-71.
- Hiraku, Y. (2010) Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance. *Environmental Health and Preventive Medicine* **15**, 63-72.
- Hofer, T., Badouard, C., Bajak, E., Ravanat, J.L., Mattsson, A., Cotgreave, I.A. (2005) Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. *Biological Chemistry* **386**, 33-337.
- Holkem, A.T., da Silva, M.P., Favaro-Trindade, C.S. (2022) Probiotics and plant extracts: A promising synergy and delivery systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **63**, 9561-9579.
- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2010) Characterization of phenolic composition in Lamiaceae species by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 10576-1058.



- Hosseini, S.F., Ramezanzade, L., Nikkhah, M. (2017) Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *International Journal of Biological Macromolecules* **105**, 1455-1463.
- Hosseini, S.M., Abbasalipourkabir, R., Jalilian, F.A., Asl, S.S., Farmany, A., Roshanaei, G., Arabestani, M.R. (2019) Doxycycline encapsulated solid lipid nanoparticles as promising tool against *Brucella melitensis* enclosed in macrophage: A pharmacodynamics study on J774A.1 cell line. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **8**, 62.
- Hozeski, B.W. (2001) *Hildegard`s Healing Plants*, Beacon Press Boston, Boston.
- HRN EN ISO 12966-1:2015, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom - 1. dio: Smjernice za suvremenu plinsku kromatografiju metilnih estera masnih kiselina.
- HRN EN ISO 15189:2012, Medicinski laboratoriji - Zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost.
- Hutchings, M.J., Price, E.A.C. (1999) *Glechoma hederacea* L. (*Nepeta glechoma* Benth., *N. hederacea* (L.) Trev.). *Journal of Ecology* **87**, 347-364.
- Hwang, J.K., Erkhembaatar, M., Gu, D.R., Lee, S.H., Lee, C.H., Shin, D.M., Lee, Y.R., Kim, M.S. (2014) *Glechoma hederacea* suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis. *Journal of Dental Research* **93**, 685-690.
- Ibrahim, H.M., Awad, M., Al-Farraj, A.S., Al-Turki, A.M. (2020) Stability and dynamic aggregation of bare and stabilized zero-valent iron nanoparticles under variable solution chemistry. *Nanomaterials* **10**, 192.
- ICCO (2023) Statistics - Data on production and grindings of cocoa beans, <<https://www.icco.org/statistics/#tab-id-6>>. Pristupljeno 25. veljače 2024.
- Ielciu, I., Niculae, M., Pall, E., Barbălată, C., Tomuță, I., Olah, N.K., Burtescu, R.F., Benedec, D., Oniga, I., Hanganu, D. (2022) Antiproliferative and antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* L. loaded liposomes. *Molecules* **27**, 3988.
- Insang, S., Kijpatanasilp, I., Jafari, S., Kitipong A. (2022) Ultrasound-assisted extraction of functional compound from mulberry (*Morus alba* L.) leaf using response surface methodology and effect of microencapsulation by spray drying on quality of optimized extract. *Ultrasonics Sonochemistry* **82**, 105806.



- Ioannidi, E., Risbo, J., Aarøe, E., van den Berg, F.W.J. (2021) Thermal analysis of dark chocolate with differential scanning calorimetry - Limitations in the quantitative evaluation of the crystalline state. *Food Analytical Methods* **14**, 2556-2568.
- IOCCC (2000) Viscosity of cocoa and chocolate products (Analytical method: 46).
- Iqdal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N., Khan, M.S. (2006) Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry* **97**, 331-335.
- Işık, N., Alteheld, B., Kühn, S., Schulze-Kaysers, N., Kunz, B., Wollseifen, H.R., Stehle, P., Lesser, S. (2014). Polyphenol release from protein and polysaccharide embedded plant extracts during *in vitro* digestion. *Food Research International* **65**, 109-114.
- Islam Shishir, M.R., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. (2018) Advances in micro and nano encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology* **78**, 34-60.
- ISO 8292-1:2008, Animal and vegetable fats and oils – Determination of solid fat content by pulsed NMR – Part 1: Direct method.
- ISO 8589:2007, Sensory analysis – General guidelines for the design of test rooms.
- Jafari, S.M., He, Y., Bhandari, B. (2010) Role of powder particle size on the encapsulation efficiency of oils during spray drying. *Drying Technology* **25**, 1081-1089.
- Jahanfar, S., Gahavami, M., Khosravi-Darani, K., Jahadi, M., Mohsin, H., Todorov, S.D., Tripathid, A.D. (2023) The effect of antioxidant properties of free and encapsulated rosemary extract in liposome on the oxidation process of canola oil. *International Journal of Food Science and Technology* **58**, 5521-5529.
- Jahurul, M.H.A., Zaidul, I.S.M., Norulaini, N.A.N., Sahena, F., Jinap, S., Azmir, J., Sharif, K.M., Mohd Omar, A.K. (2013) Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. *Journal of Food Engineering* **117**, 467-476.
- Jayanthi, R., Subash, P. (2010) Antioxidant effect of caffeic acid on oxytetracycline induced lipid peroxidation in albino rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **25**, 371-375.
- Jamshidi-Kia, F., Wibowo, J.P., Elachouri, M., Masumi, R., Salehifard-Jouneghani, A., Abolhassanzadeh, Z., Lorigooini, Z. (2020) Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *Journal of Herbmed Pharmacology* **9**, 191-199.



- Jinapong, N., Suphantharika, M., Jamnong, P. (2008) Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* **84**, 194-205.
- Jo, D., Lee, J., Noh, J., Kim, O.K., Kwon, J.H. (2001) Chemical composition and electron donating and nitrite scavenging activities of *Glechoma hederacea* var. *longituba* NAKAI. *Preventive Nutrition and Food Science* **6**, 142-146.
- Jokić, S., Aladić, K., Šubarić, D. (2018) Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Annual of the Croatian Academy of Engineering* **21**, 247-258.
- Jovanović, M., Drinić, Z., Bigović, D., Zdunić, G., Mudrić, J., Šavikin, K. (2021a) Effect of carrier type on the spray-dried willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves extract, powder properties and bioactive compounds encapsulation. *Natural Medicinal Materials* **41**, 41-45.
- Jovanović, A.A., Lević, S.M., Pavlović, V.B., Marković, S.B., Pjanović, R.V., Đorđević, V.B., Nedović, V., Bugarski, B.M. (2021b) Freeze vs. spray drying for dry wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) extract formulations: The impact of gelation as a coating material. *Molecules* **26**, 3933.
- Judzentiene, A., Stoncius, A., Budiene, J. (2015) Chemical composition of the essential oils from *Glechoma hederacea* plants grown under controlled environmental conditions in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* **27**, 454-458.
- Juranović Cindrić, I., Zeiner, M., Glamuzina, E., Stinger, G. (2013) Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. *Microchemical Journal* **107**, 185-189.
- Kalajahi, S.E.M., Ghandiha, S. (2022) Optimization of spray drying parameters for encapsulation of Nettle (*Urtica dioica* L.) extract. *LWT* **158**, 113149.
- Kalajahi, S.G., Malekjani, N., Samborska, K., Akbarbaglu, Z., Gharehbeblou, P., Sarabandi, K., Jafari, S.M. (2023) The enzymatic modification of whey-proteins for spray drying encapsulation of *Ginkgo-biloba* extract. *International Journal of Biological Macromolecules* **245**, 125548.
- Kamei, M., Nishimura, H., Takahashi, T., Takahashi, N., Inokuchi, K., Mato, T., Takahashi, K. (2016) Anti-influenza virus effects of cocoa. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**, 1150-1158.



- Karthich, M., Prince, S.M. (2006) Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **58**, 701-707.
- Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research* **387**, 147-163.
- Kaur, M., Kumar, S., Bhat, Z.F., Bekhit, A.E.D.A., Bhatti, M.A. (2021) Development of composite meat chocolate fortified with calcium and plant extracts. *Food Bioscience* **42**, 101082.
- Ke, Y., Xu, X., Wu, S., Huang, J., Geng, Y., Misra, H., Li, Y. (2013) Protective effects of extracts from *Fructus rhodomyrti* against oxidative DNA damage *in vitro* and *in vivo*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**, 507407.
- Kennedy, J., Heymann, H. (2009) Projective mapping and descriptive analysis of milk and dark chocolates. *Journal of Sensory Studies* **24**, 220-233.
- Khan, R.S., Grigor, J., Winger, R., Win, A. (2013) Functional food product development – Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends in Food Science & Technology* **30**, 27-37.
- Khiari, Z., Ndagijimana, M., Betti, M. (2014) Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. *Poultry Science* **93**, 2347-2362.
- Kikuchi, M., Goto, J., Noguchi, S., Kakuda, R., Yaoita, Y. (2008) Glycosides from whole plants of *Glechoma hederacea* L. *Journal of Natural Medicines* **62**, 479-480.
- Kim, H., Xue, X. (2020) Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *Journal of Visualized Experiments* **160**, e60682.
- Kim, J., Song, S., Lee, I., Kim, Y., Yoo, I., Ryoo, I., Bae, K. (2011) Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 3483-3487.
- Kinalski, T., Noreña, C.P.Z. (2019) Effect of spray drying encapsulation of garlic extract on inulin and thiosulfinates contents. *Journal of Food Measurement and Characterization* **13**, 2438-2447.



- Knöss, W., Chinou, I. (2012) Regulation of medicinal plants for public health – European community monographs on herbal substances. *Planta Medica* **78**, 1311-1316.
- Konar, N., Bingol, I. (2019) Effect of ball-mill process on some quality parameters of chocolate and compound chocolate: A modeling approach. *Journal of Food Process Engineering* **42**, e13154.
- Koné, W.M., Koffi, A.G., Bomisso, E.L., Tra Bi, F.H. (2012) Ethnomedical study and iron content of some medicinal herbs used in traditional medicine in Cote D'Ivoire for the treatment of anaemia. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* **9**, 81-87.
- Kongor, J.E., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E.O., Boeckx, P., Dewettinck, K. (2016) Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile: A review. *Food Research International* **82**, 44-52.
- Kováts, N., Ács, A., Gölöncsér, F., Barabás, A. (2011) Quantifying of bactericide properties of medicinal plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 777-779.
- Król-Morkisz, K., Pielichowska, K. (2019) Thermal decomposition of polymer nanocomposites with functionalized nanoparticles. U: *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles* (Pielichowski, K., Majka, T.M., ured.), Elsevier, Amsterdam, 405-435.
- Kuck, L.S., Noreña, C.P.Z. (2016) Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry* **194**, 569-576.
- Kühn, H., Wiesner, R., Alder, L., Schewe, T. (1989) Occurrence of free and esterified lipooxygenase products in leaves of *Glechoma hederacea* L. and other Labiatae. *European Journal of Biochemistry* **186**, 155-162.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2002) Biological activity of *Glechoma hederacea*. *Fitoterapia* **73**, 721-723.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2003) Isolation, structure elucidation and biological activity of hederacine A and B, two unique alkaloids from *Glechoma hederacea*. *Tetrahedron* **59**, 6403-6407.



- Kurian, J.K., Nair, G.R., Garipey, Y., Orsat, V., Lefsrud, M., Yaylayan, V., Raghavan, G.S.V. (2015) Comparative evaluation of steam-assisted treatments of biomass components and sweet sorghum bagasse. *Biofuels* **6**, 87-99.
- Lan, X., Liu, Y., Wang, Y., Tian, F., Miao, X., Wang, H., Tang, Y. (2021) Coaxial electrospun PVA/PCL nanofibers with dual release of tea polyphenols and ϵ -poly (L-lysine) as antioxidant and antibacterial wound dressing materials. *International Journal of Pharmaceutics* **601**, 120525.
- Lane, N. (2016) *Oxygen: The Molecule that Made the World*, Oxford University Press, Oxford.
- Larsson, S.C., Akesson, A., Gigante, B., Wolk, A. (2016) Chocolate consumption and risk of myocardial infarction: A prospective study and meta-analysis. *Heart* **102**, 1017-1022.
- Lathe, S.S., Terashima, C., Nakata, K., Fujishima, A. (2014) Superhydrophobic surfaces developed by mimicking hierarchical surface morphology of lotus leaf. *Molecules* **19**, 4256-4283.
- Lee, M.K. (2020) Liposomes for enhanced bioavailability of water-insoluble drugs: *In vivo* evidence and recent approaches. *Pharmaceutics* **12**, 264.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7292-7295.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., Griffith, J. (1995) p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* **81**, 1013-1020.
- Lefranc-Millot, C., Guérin-Deremaux, L., Wils, D., Neut, C., Miller, L., Saniez-Degrave, M.H. (2013) Impact of resistant dextrin on intestinal ecology: How altering the digestive ecosystem with NUTRIOSE[®], a soluble fibre with prebiotic properties, may be beneficial for health. *The Journal of International Medical Research* **40**, 211-224.
- Lenfant, F., Hartmann, C., Watzke, B., Breton, O., Loret, C., Martin, N. (2013) Impact of the shape on sensory properties of individual dark chocolate pieces. *LWT - Food Science & Technology* **51** 545-552.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **186**, 464-478.



- Li, J. (2023) A comprehensive study of the effect of elevated temperature on the extractability and rate of exaggerated and exhaustive extractions of medical devices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **235**, 115587.
- Li, J., Huang, G., Qian, H., Pi, F. (2023) Fabrication of soy protein isolate - high methoxyl pectin composite emulsions for improving the stability and bioavailability of carotenoids. *Food Bioscience* **53**, 102738.
- Lim, F., Sun, A.M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* **210**, 908-910.
- Lin, S.Y., Wang, Y.Y., Chen, W.Y., Liao, S.L., Chou, S.T., Yang, C.P., Chen, C.J. (2017) Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. *Food and Chemical Toxicology* **108**, 214-223.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Lipp, M., Simoneau, C., Ulberth, F., Anklam, E., Crews, C., Brereton, P., de Greyt, W., Schwack, W., Wiedmaier, C. (2001) Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents. *Journal of Food Composition and analysis* **14**, 399-408.
- Lippi, D. (2015) Sin and pleasure: The history of chocolate in medicine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 9936-9941.
- Liu, C., Qin, S., Xie, J., Lin, X., Zheng, Y., Yang, J., Kan, H., Shi, Z. (2021) Using carboxymethyl cellulose as the additive with enzyme-catalyzed carboxylated starch to prepare the film with enhanced mechanical and hydrophobic properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**, 638546.
- Liu, K., Chen, Y.Y., Pan, L.H., Li, Q.M., Luo, J.P., Zha, X.Q. (2022a) Co-encapsulation systems for delivery of bioactive ingredients. *Food Research International* **155**, 111073.
- Liu, P., Chen, G., Zhang, J. (2022b) A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules* **27**, 1372.
- Liu, W., Guo, R. (2005) Interaction between morin and sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 2890-2896.



- Liu, W., Ye, A., Han, F., Han, J. (2019) Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. *Advances in Colloid and Interface Science* **263**, 52-67.
- Liu, W., Ye, A., Liu, C., Liu, W., Singh, H. (2012) Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during *in vitro* digestion. *Food Research International* **48**, 499-506.
- Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J., Singh, H. (2015) Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during *in vitro* digestion. *Food Chemistry* **175**, 16-24.
- Liu, Y., Rao, L., Zhang, H., Cen, Y., Cheng, K. (2018) Conjugation of vitamin E-TPGS and guar gum to carry borneol for enhancing blood–brain barrier permeability. *Journal of Biomaterials and Applications* **33**, 590-598.
- Lombardo, D., Calandra, P., Barreca, D., Magazù, S., Kiselev, M.A. (2016) Soft interaction in liposome nanocarriers for therapeutic drug delivery. *Nanomaterials* **6**, 125.
- Lončarević, I., Pajin, B., Petrović, J., Nikolić, I., Maravić, N., Ačkar, Đ., Šubarić, D., Zarić, D., Miličević, B. (2021) White chocolate with resistant starch: Impact on physical properties, dietary fiber content and sensory characteristics. *Molecules* **26**, 5908.
- Lončarević, I., Pajin, B., Šaponjac, V.T., Petrović, J., Vulić, J., Fišteš, A., Jovanović, P. (2019) Physical, sensorial and bioactive characteristics of white chocolate with encapsulated green tea extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**, 5834-5841.
- Long, L.H., Hoi, A., Halliwell, B. (2010) Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **501**, 162-169.
- Lopez-Polo, J., Silva-Weiss, A., Giménez, B., Cantero-López, P., Vega, R., Osorio, F.A. (2020) Effect of lyophilization on the physicochemical and rheological properties of food grade liposomes that encapsulate rutin. *Food Research International* **130**, 108967.
- Lourenço, S.C., Moldão-Martins, M., Alves, V.D. (2020) Microencapsulation of pineapple peel extract by spray drying using maltodextrin, inulin, and Arabic gum as wall matrices. *Foods* **9**, 1-17.
- Lousinian, S., Mackie, A.R., Rigby, N.M., Panayiotou, C., Ritzoulis, C. (2018) Microcalorimetry of the intestinal mucus: Hydrogen bonding and self-assembly of mucin. *International Journal of Biological Macromolecules* **112**, 555-560.



- Lovkova, M.Y., Buzuk, G.N., Sokolova, S.M., Kliment'eva, N.I. (2001) Chemical features of medicinal plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* **37**, 229-237.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Lu, C., Zou, Y., Liu, Y., Niu, Y. (2017) Rosmarinic acid counteracts activation of hepatic stellate cells *via* inhibiting the ROS-dependent MMP-2 activity: Involvement of Nrf2 antioxidant system. *Toxicology and Applied Pharmacology* **318**, 69-78.
- Lu, W., Yang, X., Shen, J., Li, Z., Tan, S., Liu, W., Cheng, Z. (2021) Choosing the appropriate wall materials for spray-drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. *Powder Technology* **394**, 562-574.
- Luo, M., Zhang, R., Liu, L., Chi, J., Huang, F., Dong, L., Ma, Q., Jia, X., Zhang, M. (2020a) Preparation, stability and antioxidant capacity of nano liposomes loaded with procyanidins from lychee pericarp. *Journal of Food Engineering* **284**, 110065.
- Luo, Y., Ma, Z., Xu, X., Qi, H., Cheng, Z., Chen, L. (2020b) Anticancer effects of rosmarinic acid in human oral cancer cells is mediated via endoplasmic reticulum stress, apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of cell migration. *JBUON* **25**, 1245-1250.
- Luo, S., Wehr, N.B. (2009) Protein carbonylation: Avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report* **14**, 159-166.
- Madhavadas, S., Kapgal, V.K., Kutty, B.M., Subramanian, S. (2015) The neuroprotective effect of dark chocolate in monosodium glutamate-induced nontransgenic Alzheimer disease model rats: Biochemical, behavioral, and histological studies. *Journal of Dietary Supplements* **13**, 449-460.
- Magri, G., Franzé, S., Musazzi, M., Selmin, F., Cilurzo, F. (2019) Data on spray-drying processing to optimize the yield of materials sensitive to heat and moisture content. *Data in Brief* **23**, 103792.
- Mainente, F., Piovan, A., Zanoni, F., Chignola, R., Cerantola, S., Faggin, S., Giron, M.C., Filippini, R., Seraglia, R., Zoccatelli, G. (2022) Spray-drying microencapsulation of an extract from *Tilia tomentosa* moench flowers: Physicochemical characterization and *in vitro* intestinal activity. *Plant Foods for Human Nutrition* **77**, 467-473.
- Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., Duda-Chodak, A. (2021) The Interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants* **10**, 188.



- Maleš, Ž., Bojić, M. (2017) The most commonly used medicinal plants from Croatia. U: *New Aspects in Medicinal Plants and Pharmacognosy* (Tiezzi, A., Karpiński, T.M., ured.), JB Books, Poznań, str. 54-102.
- Mamedov, N. (2012) Medicinal plants studies: History, challenges and prospective. *Medicinal & Aromatic Plants* **1**, 1000e133.
- Man, Y.B.C., Irwandi, J., Abdullah, W.J.W. (1999) Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavor. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 1075-1080.
- Mandura Jarić, A., Čikoš, A., Povrnić, M., Aladić, K., Jokić, S., Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2023b) *Teucrium montanum* L. – Unrecognized source of phenylethanoid glycosides: Green extraction approach and elucidation of phenolic compounds via NMR and UHPLC-HR MS/MS. *Antioxidants* **12**, 1903.
- Mandura Jarić, A., Haramustek, L., Nižić Nodilo, L., Vrsaljko, D., Petrović, P., Kuzmić, S., Jozinović, A., Aladić, K., Jokić, S., Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Komes, Draženka (2023a) A novel approach to serving plant-based confectionery - The employment of spray drying in the production of carboxymethyl cellulose-based delivery systems enriched with *Teucrium montanum* L. extract. *Foods* **13**, 372.
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., D'Alessandro, A.G. (2022) Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen* **2**, 48-78.
- Martínez-Ballesta, M.C., Dominguez-Perles, R., Moreno, D.A., Muries, B., Alcaraz-López, C., Bastías, E., García-Viguera, C., Carvajal, M. (2010) Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **30**, 295-309.
- Martin, W.F., Armstrong, L.E., Rodriguez, N.R. (2005) Dietary protein intake and renal function. *Nutrition & Metabolism* **2**, 25.
- Martinić, A., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Žižek, K., Komes, D. (2022) Microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) leaf extract by spray drying. *Food Technology & Biotechnology* **60**, 237-252.



- Masuda, A., Takahashi, C., Inai, M., Miura, Y., Masuda, T. (2013) Chemical evidence for potent xanthine oxidase inhibitory activity of *Glechoma hederacea* var. *grandis* leaves (Kakidoushi-Cha). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **59**, 570-575.
- Matkowski, A., Tasarz P., Szypuła E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research* **2**, 321-330.
- McCleary, B.V., DeVries, J.W., Rader, J.I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D.C., Okuma, K. (2012) Determination of insoluble, soluble, and total dietary fibre (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *Journal of AOAC International* **95**, 824-844.
- Mehrinfar, R., Frishman, W.H. (2008) Flavonol-rich cocoa – A cardioprotective nutraceutical. *Cardiology in Review* **16**, 109-115.
- Mellinas, C., Ramos, M., Jiménez, A., Garrigós, M.C. (2020) Recent trends in the use of pectin from agro-waste residues as a natural-based biopolymer for food packaging applications. *Materials* **13**, 673.
- Miere Groza, F., Vicas, S.I., Timar, A.V., Ganea, M., Zdrinca, M., Cavalu, S., Fritea, L., Vicas, L., Muresan, M., Pallag, A., Dobjanschi, L. (2021) Preparation and characterization of two different liposomal formulations with bioactive natural extract for multiple applications. *Processes* **9**, 432.
- Miller, G.D., Jarvis, J.K., McBean, L.D. (2001) The importance of meeting calcium needs with foods. *Journal of the American College of Nutrition* **20**, 168S-185S.
- Minatel, I.O., Borges, C.V., Ferreira, M.I., Gomez, H.A.G., Chen, C.Y.O., Lima, G.P.P. (2017) Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. U: *Phenolic Compounds - Biological Activity* [online] (Soto-Hernández, M., ured.), IntechOpen, <<https://www.intechopen.com/chapters/53128>>. Pristupljeno 20. veljače 2023.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Boursillieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014) A standardised static *in vitro*



- digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function* **5**, 1113-1124.
- Misra, S., Trinavee, K., Gunda, N.S.K., Mitra, S. (2020) Encapsulation with an interfacial liquid layer: Robust and efficient liquid-liquid wrapping. *Journal of Colloid and Interface Science* **558**, 334-344.
- Mitich, L.W. (1994) Ground ivy. *Weed technology* **8**, 413-415.
- Mockute, D., Bernotiene, G., Judzentiene, A. (2007) The essential oil of ground ivy (*Glechoma hederacea* L) growing wild in Eastern Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* **19**, 449-451.
- Mohammed, N.K., Tan, C.P., Manap, Y.A., Muhiadin, B.J., Hussin, A.S.M. (2020) Spray drying for the encapsulation of oils – A review. *Molecules* **25**, 3873.
- Mordor Intelligence (2022) Chocolate market – Growth, trends, and forecasts (2023-2028), <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/chocolate-market>>. Pristupljeno 25. siječnja 2023.
- Moskaug, J., Carlsen, H., Myhrstad, M.C.W., Blomhoff, R. (2005) Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 277S-283S.
- Motamayor, J.C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J.W., Loor, R., Kuhn, D.N., Brown, S. (2008) Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *Plos One* **3**, e3311.
- Mounsey, J.S., Hogan, S.A., Murray, B.A., O’Callaghan, D.J. (2012) Effects of hydrolysis on solid-state relaxation and stickiness behavior of sodium caseinate-lactose powders. *Journal of Dairy Science* **95**, 2270-2281.
- Mudgil, D. (2018) Partially hydrolyzed guar gum: Preparation and properties. U: *Polymers for Food Applications* (Gutiérrez, T.J., ured.), Springer, str. 529-549.
- Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B.S. (2012) X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum. *International Journal of Biological Macromolecules* **50**, 1035-1039.
- Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B.S. (2014) Guar gum: processing, properties and food applications - A review. *Journal of Food Science and Technology* **51**, 409-418.



- Muhammad, D.R.A., Tuenter, E., Patria, G.D., Foubert, K., Pieters, L., Dewettinck, K. (2021) Phytochemical composition and antioxidant activity of *Cinnamomum burmannii* Blume extracts and their potential application in white chocolate. *Food Chemistry* **340**, 127983.
- Muhoza, B., Qi, B., Harindintwali, J.D., Koko, M.Y.F., Zhang, S., Li, Y. (2022) Combined plant protein modification and complex coacervation as a sustainable strategy to produce coacervates encapsulating bioactives. *Food Hydrocolloids* **124**, 107239.
- Mumuni, M.A., Kenechukwu, F., Ofokansi, K.C., Attama, A.A., Díaz, D.D. (2020) Insulin-loaded mucoadhesive nanoparticles based on mucin-chitosan complexes for oral delivery and diabetes treatment. *Carbohydrate Polymers* **229**, 115506.
- Murugesan, R., Orsat, V. (2012) Spray drying for the production of nutraceutical ingredients – A review. *Food and Bioprocess Technology* **5**, 3-14.
- Naik, B., Kumar, V. (2014) Cocoa butter and its alternatives: A review. *Journal of Bioresource Engineering and Technology* **1**, 7-17.
- Nastaj, M., Sołowiej, B.G., Stasiak, D.M., Mleko, S., Terpiłowski, K., Łyszczek, R.J., Tomasevic, I.B., Tomczyńska-Mleko, M. (2022) Development and physicochemical properties of reformulated, high-protein, untempered sugar-free dark chocolates with addition of whey protein isolate and erythritol. *International Dairy Journal* **134**, 105450.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* **1**, 1806-1815.
- Nguyen, M.T., Chuyen, H.V., Tran, M.D., Nguyen, Q.V. (2022) Microencapsulation of *Syzygium zeylanicum* (L.) DC. extract using spray drying: Effects of wall materials on physicochemical characteristics and biological activities of the microcapsules. *Journal of Food Processing and Preservation* **46**, e16647.
- Nguyen, T.X., Huang, L., Gauthier, M., Yang, G., Wang, Q. (2016) Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery. *Nanomedicine* **11**.
- Nightingale, L.M., Lee, S.Y., Engeseth, N.J. (2011) Impact of storage on dark chocolate: Texture and polymorphic changes. *Journal of Food Science* **76**, C142-C153.
- Nikolić, T., Topić, J. (2005) *Crvena Knjiga Vaskularne Flore Hrvatske*, Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, Hrvatska.



- Nikolić, T. (2001) The diversity of Croatian vascular flora based on the Checklist and CROFlora database. *Acta Botanica Croatica* **60**, 49-67.
- Nikolić, T., Rešetnik, I. (2007) Plant uses in Croatia. *Phytologia Balcanica* **13**, 229-238.
- NOAA Climate (2024) Climate change: Global temperature, <<https://www.climate.gov/news-features/understanding-climate/climate-change-global-temperature>>. Pristupljeno 26. veljače 2024.
- Norazlina, M.R., Jahurul, M.H.A., Hasmadi, M., Mansoor, A.H., Norliza, J., Patricia, M., George, M.R.R., Noorakmar, A.W., Lee, J.S., Fan, H.Y. (2021) Trends in blending vegetable fats and oils for cocoa butter alternative application: A review. *Trends in Food Science & Technology* **116**, 102-114.
- Norkaew, O., Thitisut, P., Mahatheeranont, S., Pawin, B., Sookwong, P., Yodpitak, S., Lungkaphin, A. (2019) Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules. *Food Chemistry* **294**, 493-502.
- Oalđe, M., Kolarević, S., Živković, J., Alimpić Aradski, A., Jovanović Marić, J., Kračun Kolareić, M., Đorđević, J., Marin, P.D., Šavikin, K., Vuković-Gačić, B., Duletić-Laušević, S. (2021) A comprehensive assessment of the chemical composition, antioxidant, genoprotective and antigenotoxic activities of Lamiaceae species using different experimental models *in vitro*. *Food & Function* **12**, 3233.
- Ocak, B. (2020) Gum arabic and collagen hydrolysate extracted from hide fleshing wastes as novel wall materials for microencapsulation of *Origanum onites* L. essential oil through complex coacervation. *Environmental Science and Pollution Research* **27**, 42727-42737.
- Odeh, D., Oršolić, N., Adrović, E., Gaćina, L., Perić, P., Odeh, S., Balta, V., Lesar, N., Kukolj, M. (2022) Effects of volatile anaesthetics and iron dextran on chronic inflammation and antioxidant defense system in rats. *Antioxidants* **11**, 708.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351-358.
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., Nebesny, E. (2015) The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region, and processing operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**, 1176-1192.



- Ostrowska-Ligęza, E., Dolatowska-Żebrowska, K., Brzezińska, R., Wirkowska-Wojdyła, M., Bryś, J., Piasecka, I., Górka, A. (2023) Characterization of thermal properties of ruby chocolate using DSC, PDSC and TGA methods. *Applied Sciences* **13**, 5221.
- Ostrowska-Ligęza, E., Marzec, A., Górka, A., Wirkowska-Wojdyła, M., Bryś, J., Rejch, A., Czarkowska, K. (2019) A comparative study of thermal and textural properties of milk, white and dark chocolates. *Thermochimica Acta* **671**, 60-69.
- Ota, A., Abramovič, H., Abram, V., Poklar Ulrih, N. (2011) Interactions of *p*-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes. *Food Chemistry* **125**, 1256-1261.
- Oteiza, P.I., Erlejman, A.G., Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Fraga, C.G. (2005) Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical & Developmental Immunology* **12**, 19-25.
- Ou, J., Huang, J., Wang, M., Ou, S. (2017) Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation *in vitro*. *Food Chemistry* **221**, 1057-1061.
- Padmore, J.M. (1990a). Animal feed - AOAC official method 930.15 - Moisture in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, Vol. 1, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 69-70.
- Padmore, J.M. (1990b) Animal feed - AOAC official method 976.05 - Protein (crude) in animal feed, automated Kjeldhal method. U: *Official Methods of Analysis*, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 72.
- Padmore, J.M. (1990c) Animal feed - AOAC official method 920.39 - Fat (crude) or ether extract in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 79.
- Padmore, J.M. (1990d). Animal feed - AOAC official method 942.05 - Ash of animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 70.
- Pan, J., Lian, H., Jia, H., Hao, R., Wang, Y., Ju, H., Li, S., Dong, X. (2020). Dose affected the role of gallic acid on mediating gelling properties of oxidatively stressed Japanese seerfish myofibrillar protein. *LWT* **118**, 108849.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016) Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* **5**, e47.



- Panwar, R., Raghuwanshi, N., Srivastava, A.K., Sharma, A.K., Pruthi, V. (2018) *In-vivo* sustained release of nanoencapsulated ferulic acid and its impact in induced diabetes. *Materials Science & Engineering C* **92**, 381-392.
- Pari, L., Prasath, A. (2008) Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chemico-Biological Interactions* **173**, 77-83.
- Passos, I.D., Mironidou-Tzouveleki, M. (2016) Hallucinogenic plants in the mediterranean countries. U: *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse* (Preedy, V.R., ured.), Academic Press, 761-772.
- Patil, S.L., Rao, N.B., Somashekarappa, H.M., Rajashekhar, K.P. (2014) Antigenotoxic potential of rutin and quercetin in Swiss mice exposed to gamma radiation. *Biomedical Journal* **37**, 305-313.
- Păvăloiu, R.D., Sha'at, F., Neagu, G., Deaconu, M., Bubueanu, C., Albulescu, A., Sha'at, M., Hlevca, C. (2021) Encapsulation of polyphenols from *Lycium barbarum* leaves into liposomes as a strategy to improve their delivery. *Nanomaterials* **11**, 1938.
- Pavek, P.L.S. (2013) Plant guide for ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). USDA Natural Resources Conservation Service, Pullman, SAD.
- Peñalva, R., Morales, J., González-Navarro, Larrañeta, E., Quincoces, G., Peñuelas, I., Irache, J.M. (2018) Increased oral bioavailability of resveratrol by its encapsulation in casein nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 2816.
- Peng, H., Xiong, H., Li, J., Chen, L., Zhao, Q. (2010) Methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan based microcapsules: Synthesis, characterization and properties as a potential hydrophilic wall material for stabilization and controlled release of algal oil. *Journal of Food Engineering* **101**, 113-119.
- Peng, Y., Meng, Q., Zhou, J., Chen, B., Xi, J., Long, P., Zhang, L., Hou, R. (2018) Nanoemulsion delivery system of tea polyphenols enhanced the bioavailability of catechins in rats. *Food Chemistry* **242**, 527-532.
- Pereira, A.G., Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Jimenez-Lopez, C., Lourenço-Lopes, C., Carpena, M., Otero, P., Gullón, P., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J. (2020) Culinary and nutritional value of edible wild plants from northern Spain rich in phenolic compounds with potential health benefits. *Food & Function* **11**, 8493-8515.



- Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., da Silva Brum, L.F., Picada, J.N., Ardenghi, P. (2005) Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological Research* **52**, 199-203.
- Perez, M., Lopez-Yerena, A., Vallverdú-Queralt, A. (2022) Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: a challenge for the chocolate industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **62**, 475-489.
- Perrett, S., Golding, M., Williams, P. (1991) A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **43**, 154-161.
- Petrovska, B.B. (2011) Historical review of medicinal plants` usage. *Pharmacognosy Reviews* **6**, 1-5.
- Pettinato, M., Trucillo, P., Campardelli, R., Perego, P., Reverchon, E. (2020) Bioactives extraction from spent coffee grounds and liposome encapsulation by a combination of green technologies. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* **151**, 107911.
- Pham-Huy, L., He, H., Pham-Huy, C. (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* **4**, 89-96.
- Phillips, G.O., Williams, P.A. (2021) *Handbook of Hydrocolloids*, 3. izd., Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Piao, Y., Liu, Y., Xie, X. (2013) Change trends of organ weight background data in Sprague Dawley rats at different ages. *Journal of Toxicologic Pathology* **26**, 29-34.
- Pieczykolan, E., Kurek, M.A. (2019) Use of guar gum, gum arabic, pectin, beta-glucan and inulin for microencapsulation of anthocyanins from chokeberry. *International Journal of Biological Macromolecules* **129**, 665-671.
- Piekarska-Radzik, L., Klewicka, E. (2020) Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: A review. *European Food Research and Technology* **247**, 9-24.
- Piñón-Balderrama, C.I., Leyva-Porras, C., Terán-Figueroa, Y., Espinosa-Solís, V., Álvarez-Salas, C., Saavedra-Leos, M.Z. (2020) Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. *Processes* **8**, 889.



- Piovesana, A., Noreña, C.P.Z. (2018) Microencapsulation of bioactive compounds from hibiscus calyces using different encapsulating materials. *International Journal of Food Engineering* **14**, 20170170.
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010) Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International* **43**, 2341-2348.
- Plaza, M., Batista, A.G., Carazin, C.B., Sandahl, M., Turner, C., Ostaman, E., Marostica Junior, R. (2016) Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. *Food Chemistry* **211**, 185-197.
- Plaza, M., Domínguez-Rodríguez, G., Castro-Puyana, M., Marina, M.L. (2018) Polyphenols analysis and related challenges. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (Galanakis, C.M., ured.), Woodhead Publishing, str. 177-232.
- Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Ž., Mornar, A., Nigović, B., Kujundžić, N. (2009) Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules* **14**, 2466–2490.
- Pohle, W., Gauger, D.R., Fritzsche, H., Rattay, B., Selle, C., Binder, H., Böhling, H. (2001) FTIR-spectroscopic characterization of phosphocholine-headgroup model compounds. *Journal of Molecular Structure* **563–564**, 463-467.
- Polat, D.G., Durmaz, Y., Konar, N., Toker, O.S., Palabiyik, I., Tasan, M. (2020) Using encapsulated *Nannochloropsis oculata* in white chocolate as coloring agent. *Journal of Applied Phycology* **32**, 3077-3088.
- Poliński, S., Kowalska, S., Topka, P., Szydłowska-Czerniak, A. (2021) Physicochemical, antioxidant, microstructural properties and bioaccessibility of dark chocolate with plant extracts. *Molecules* **26**, 5523.
- Poliński, S., Topka, P., Tańska, M., Kowalska, S., Czaplicki, S., Szydłowska-Czerniak, A. (2022) Impact of bioactive compounds of plant leaf powders in white chocolate production: Changes in antioxidant properties during the technological processes. *Antioxidants* **11**, 752.
- Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (2013) *Narodne novine* **83**, Zagreb.



- Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima (2005) *Narodne novine* **73**, Zagreb.
- Pravilnik o stavljanju u promet te o označavanju i oglašavanju tradicionalnih biljnih lijekova (2010) *Narodne novine* **89**, Zagreb.
- Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (2013) *Narodne novine* **55**, Zagreb.
- Purdel, N.C., Margina, D., Ilie, M. (2014) Current methods used in the protein carbonyl assay. *Annual Research & Review in Biology* **4**, 2015-2026.
- Qiao, Z., Koizumi, Y., Zhang, M., Natsui, M., Flores, M.J., Gao, L., Yusa, K., Koyota, S., Sugiyama, T. (2012) Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**, 1877-1883.
- Qin, X.W., Lai, J.X., Tan, L.H., Hao, C.Y., Li, F.P., He, S.Z., Song, Y.H. (2016) Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. *International Journal of Food Properties* **20**, 2261-2275.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011) Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie* **50**, 586-621.
- Radulović, N., Dorđević, N., Marković, M., Palić, R. (2010) Volatile constituents of *Glechoma hirsuta* Waldst. & Kit. and *G. hederacea* L. (Lamiaceae). *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* **24**, 67-76.
- Radünz, M., Hackbart, H.C.D.S, Bona, N.P., Pedra, N.S., Hoffmann, J.F., Stefanello F.M., Zavareze, E.D.R. (2020) Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **192**, 111020.
- Rahman, M.S., Hasan, M.S., Nitai, A.S., Nam, S., Karmakar, A.K., Ahsan, M.S., Shiddiky, M.J.A., Ahmed, M.B. (2021) Recent developments of carboxymethyl cellulose. *Polymers* **13**, 1345.
- Ramírez, C., Gallegos, I., Ihl, M., Bifani, V. (2012) Study of contact angle, wettability and water vapor permeability in carboxymethylcellulose (CMC) based film with murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) extract. *Journal of Food Engineering* **109**, 424-429.



- Rando, P., Ramaioli, M. (2021) Food 3D printing: Effect of heat transfer on print stability of chocolate. *Journal of Food Engineering* **294**, 110415.
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S.R., Chougule, M.B., Tekade, R.K. (2019) Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. U: *Drug Basic Fundamentals of Drug Delivery* (Tekade, R.K., ured.), Academic Press, London, str. 369-400.
- Ravichandran, R., Palaniraj, R., Thaw Saw, N.M.M., Gabr, A.M.M., Ahmed, A.R., Knorr, D., Smetanska, I. (2014) Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology* **51**, 2216-2221.
- Razavizadeh, B.M., Tabrizi, P. (2021) Characterization of fortified compound milk chocolate with microcapsulated chia seed oil. *LWT* **150**, 111993.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1231-1237.
- Reczek, C.R., Chandel, N.S. (2017) The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annual Review of Cancer Biology* **1**, 79-98.
- Refai, H., Hassan, D., Abdelmonem, R. (2017) Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Delivery* **24**, 278-288.
- Regecova, V., Jurkovicova, J., Babjakova, J., Bernatova, I. (2019) The effect of a single dose of dark chocolate on cardiovascular parameters and their reactivity to mental stress. *Journal of the American College of Nutrition* **39**, 414-421.
- Rehder, D. (2020) The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Inorganica Chimica Acta* **504**, 119445.
- Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R.M., Spotti, M.J., Bakry, A.M., Khan, I.M., Zhao, L., Riaz, T., Tong, Q. (2019) Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology* **90**, 35-46.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125-1131.
- Riberio, A.M., Estevinho, B.N., Rocha, F. (2019) Spray drying encapsulation of elderberry extract and evaluating the release and stability of phenolic compounds in encapsulated powders. *Food and Bioprocess Technology* **12**, 1381-1394.



- Riberio, S., Almeida, R., Batista, L., Lima, J., Sarinho, A., Nascimento, A., Lisboa, H. (2024) Investigation of guar gum and xanthan gum influence on essential thyme oil emulsion properties and encapsulation release using modeling tools. *Foods* **13**, 816.
- Robson, A.L., Dastoor, P.C., Flynn, J., Palmer, W., Marin, A., Smith, D.W, Woldu, A., Hua, S. (2018) Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposomes morphology. *Frontiers in Pharmacology* **9**, 80.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M.E. (2011) Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International* **44**, 250-258.
- Rodrigues-Silva, N. (2012) Chocolate: Psychopharmacological aspects, mood, and addiction. U: *Chocolate in Health and Nutrition* (Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S., ured.), Humana Press, str. 421-435.
- Rosenberg, M., Kopelman, I.J., Talminm Y. (1985) A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science* **50**, 139-144.
- Routray, W., Orsat, V. (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: A review. *Food and Bioprocess Technology* **5**, 409-424.
- Rowland, R.N., Woodley, J.F. (1980) The stability of liposomes *in vitro* to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **620**, 400-409.
- Rudrapal, M., Khairnar, S.J., Khan, J., Dukhyil, A.B., Ansari, M.A., Alomary, M.N., Alshabrm, F.M., Palai, S., Deb, P.K., Devi, R. (2022) Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. *Frontiers in Pharmacology* **13**, 806470.
- Saifullah, M., Shishir, M.R.I., Ferdowsi, R., Rahman, M.R.T., Van Vuong, Q. (2019) Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science & Technology* **86**, 230-251.
- Sallustio, V., Chiochio, I., Mandrone, M., Cirrincione, M., Protti, M., Farruggia, G., Abruzzo, A., Luppi, B., Bigucci, F., Mercolini, L., Poli, F., Cerchiara, T. (2022) Extraction,



- encapsulation into lipid vesicular systems, and biological activity of *Rosa canina* L. bioactive compounds for dermocosmetic use. *Molecules* **27**, 3025.
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J.A., Manzano-Agugliaro, F. (2020) Worldwide research trends on medicinal plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**, 3376.
- Samborska, K., Barańska, A., Szulc, K., Jankowska, E., Truszkowska, M., Ostrowska-Ligeża, E., Wołosiak, R., Szymańska, E., Jedlińska, A. (2020) Reformulation of spray-dried apple concentrate and honey for the enhancement of drying process performance and the physicochemical properties of powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100**, 2224-2235.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress* **23**, 302-315.
- Santos, D., Maurício, A.C., Sencadas, V., Santos, J.D., Fernandes, M.H., Gomes, P.S. (2018) Spray drying: An overview. U: *Biomaterials - Physics and Chemistry* (Pignatello, R., Musumeci, T., ured.), IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.72247.
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Oludemi, T., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S. (2019) Plant phenolics as functional food ingredients. U: *Advances in Food and Nutrition Research* **90** (Özogul, F., ured.), Academic Press, str. 183-257.
- Saporta, G., Niang, N. (2009) Principal component analysis: Application to statistical process control. U: *Data Analysis* (Govaert, G., ured.), London, UK, str. 1-23.
- Sarkar, S., Gupta, S., Variyar, P.S., Sharma, A., Singhal, R.S. (2013) Hydrophobic derivatives of guar gum hydrolyzate and gum Arabic as matrices for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate Polymers* **95**, 177-182.
- Sarmadi, B., Ismail, A., Yusof, L., Yunoh, M.F.M. (2020) Mechanism of action of cocoa on bone metabolism in calcium- and estrogen-deficient rat model of osteoporosis: Evidence for site and dose-related responses and involvement of IGF-I. *Journal of Functional Foods* **66**, 103793.
- Sasaki, Y.F., Tsuda, S., Izumiya, F., Nishidate, E. (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow)



- using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutation Research* **388**, 33-44.
- Savković, D. (2017) *Enciklopedija Ljekovitog, Korisnog i Medonosnog Bilja*, Begen, Zagreb.
- Shariare, M.H., Pinky, N.J.K., Abedin, J., Kazi, M., Aldughaim, M.S., Uddin, M.N. (2022) Liposomal drug delivery of *Blumea lacera* leaf extract: *In-vivo* hepatoprotective effects. *Nanomaterials* **12**, 2262.
- Sharma, G., Sharma, S., Kumur, A., Al-Muhtaseb, A., Naushad, M., Ghfar, A.A., Mola, G.T., Stadler, F.J. (2018) Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. *Carbohydrate Polymers* **199**, 534-545.
- Sogut, O., Sezer, U.A., Sezer, S. (2021) Liposomal delivery systems for herbal extracts. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **61**, 102147.
- Schmidt, M.M., Fontoura, A.M., Vidal, A.R., Dornelles, R.C.P., Kubota, E.H., Mello, R.O., Cansian, R.L., Demiate, I.M., Oliveira, C.S. (2020) Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue. *Food Science and Technology* **40**, 355-362.
- Schouteten, J.J., Lemarcq, V., Van de Walle, D., Sioriki, E., Dewettinck, K. (2023) Microwave roasting as an alternative to convection roasting: Sensory analysis and physical characterization of dark chocolate. *Foods* **12**, 887.
- Schumacher, A.B., Brandelli, A., Macedo, F.C., Pieta, L., Klug, T.V., de Jong, E.V. (2010) Chemical and sensory evaluation of dark chocolate with addition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Science and Technology* **47**, 202-206.
- Serpeloni, J.M., dos Reis, M.B., Rodrigues, J., dos Santos, L.C., Vilegas, W., Varanda, E.A., Dokkedal, A.L., Cólus, I.M.S. (2008) *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis* **23**, 501-507.
- Shin, G.H., Kim, J.T. (2021) Comparative study of chitosan and oligochitosan coatings on mucoadhesion of curcumin nanosuspensions. *Pharmaceutics* **13**, 2154.
- Shin, J.H., Kim, C.S., Cha, L., Kim, S., Lee, S., Chae, S., Chun, W.Y., Shin, D.M. (2022) Consumption of 85% cocoa dark chocolate improves mood in association with gut microbial changes in healthy adults: A randomized controlled trial. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **99**, 108854.



- Shishir, M.R.I., Chen, W. (2017) Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetables juices. *Trends in Food Science & Technology* **65**, 49-67.
- Sik, B., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., Hanczné, E.L., Ajtony, Z. (2019) Recent advances in the analysis of rosmarinic acid from herbs in the Lamiaceae family. *Natural Product Communications* **14**.
- Sile, I., Krizhanovska, V., Nakurte, I., Mezaka, I., Kalane, L., Filipovs, J., Vecvanags, A., Pugovics, O., Grinberga, S., Dambrova, M., Kronberga, A. (2022) Wild-grown and cultivated *Glechoma hederacea* L.: Chemical composition and potential for cultivation in organic farming conditions. *Plants* **11**, 819.
- Silva, A.E., Oliveira, E.E., Gomes, M.C.S., Marcelino, H.R., Silva, K.C.H., Souza, B.S., Nagashima-Jr., T., Ayala, A.P., Oliveira, A.G., Tabosa do Egito, E.S. (2013) Producing xylan/Eudragit® S100-based microparticles by chemical and physico-mechanical approaches as carriers for 5-aminosalicylic acid. *Journal of Microencapsulation* **30**, 787-795.
- Silva, J.P., Gomes, A.C., Coutinho, O.P. (2008) Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology* **601**, 50-60.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175**, 184-191.
- Singh, P., Kesharwani, R.K., Keservani, R.K. (2017) Antioxidants and vitamins: Roles in cellular function and metabolism. U: *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity* (Bagchi, D., ured.), Academic Press, New York, str. 485-407.
- Singh, S., Dixit, D. (2014) A review of spray drying: Emerging technology in food industry. *International Journal of Applied Engineering and Technology* **4**, 1-8.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144-158.
- Sipek, M., Perčin, A., Zgorelec, Ž., Sajna, N. (2021) Morphological plasticity and ecophysiological response of ground ivy (*Glechoma hederacea*, Lamiaceae) in contrasting natural habitats within its native range. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **155**, 136-147.



- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite* **51**, 456-467.
- Sławińska, N., Kluska, M., Moniuszko-Szajwaj, B., Stochmal, A., Wozniak, K., Olas, B. (2023) New aspect of composition and biological properties of *Glechoma hederacea* L. herb: Detailed phytochemical analysis and evaluation of antioxidant, anticoagulant activity and toxicity in selected human cells and plasma *in vitro*. *Nutrients* **15**, 1671.
- Spencer, J.P. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition* **133**, 3255-3261.
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P.S., Kapoor, A., Vo, D.V.N., Prabhakar, S. (2021) Techniques and modelling of polyphenol extraction from food: A review. *Environmental Chemistry Letters* **19**, 3409-3443.
- Stadtman, E.R. (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radical Research* **40**, 1250-1258.
- Stanojkovic-Sebic, A., Pivic, R., Josic, D., Dinic, Z., Stanojkovic, A. (2014) Heavy metals content in selected medicinal plants commonly used as components for herbal formulations. *Journal of Agricultural Science* **21**, 317-325.
- Statista (2021a) Size of the functional food market worldwide from 2019 to 2027, <<https://www.statista.com/statistics/1264165/global-functional-food-market-size/>>. Pristupljeno 4. ožujka 2023.
- Statista (2021b) Per capita chocolate consumption worldwide in 2017, by country, <<https://www.statista.com/statistics/819288/worldwide-chocolate-consumption-by-country/>>. Pristupljeno 28. veljače 2024.
- Statista (2022a) Global cocoa bean production from 2019/20 to 2021/22, by country, <<https://www.statista.com/statistics/263855/cocoa-bean-production-worldwide-by-region/>>. Pristupljeno 23. siječnja 2023.
- Statista (2022b) Size of the chocolate confectionery market worldwide from 2016 to 2027, <<https://www.statista.com/forecasts/983554/global-chocolate-confectionery-market-size>>. Pristupljeno 25. siječnja 2023.
- Statista (2023a) Cocoa production worldwide from 1980/81 to 2022/23, <<https://www.statista.com/statistics/262620/global-cocoa-production/>>. Pristupljeno 23. veljače 2024.



- Statista (2023b) World cocoa price from 2008 to 2022, <<https://www.statista.com/statistics/237152/world-cocoa-grindings/>>. Pristupljeno 23. veljače 2024.
- Statista (2023c) Average prices for cocoa worldwide from 2014 to 2025, <<https://www.statista.com/statistics/675801/average-prices-cocoa-worldwide/>>. Pristupljeno 23. veljače 2024.
- Stortz, T.A., Marangoni, A.G. (2011) Heat resistant chocolate. *Trends in Food Science & Technology* **22**, 201-214.
- Stranska, I., Skalicky, M., Novak, J., Matyasova, E., Hejnak, V. (2013) Analysis of selected poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivars: Pharmaceutically important alkaloids. *Industrial Crops and Products* **41**, 120-126.
- Sun, P., Xia, B., Ni, Z.J., Wang, Y., Elam, E., Thakur, K., MA, Y.L., Wei, Z.J. (2021) Characterization of functional chocolate formulated using oleogels derived from β -sitosterol with γ -oryzanol/lecithin/stearic acid. *Food Chemistry* **360**, 130017.
- Sun, Z., Zussman, E., Yarin, A.L., Wendorff, J.H., Greiner, A. (2002) Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Materials* **15**, 1929-1932.
- Sun, X., Cameron, R.G., Bai, J. (2020) Effect of spray-drying temperature on physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of pectin/sodium alginate microencapsulated carvacrol. *Food Hydrocolloids* **100**, 105420.
- Sun-Waterhouse, D., Wadhwa, S.S. (2013) Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: A review. *Food and Bioprocess Technology* **6**, 607-627.
- Süntar, I. (2020) Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: Role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews* **19**, 1199-1209.
- Šakić Bobić, B. (2021) Uzgoj ljekovitog bilja u Hrvatskoj – Isplativ! <<https://gospodarski.hr/rubrike/ljekovito-bilje-rubrike/uzgoj-ljekovitog-bilja-u-hrvatskoj-isplativ/>>. Pristupljeno 15. veljače 2023.
- Šavikin, K., Nastić, N., Janković, T., Bigović, D., Miličević, B., Vidović, S., Menković, N., Vladić, J. (2021) Effect of type and concentration of carrier material on the encapsulation of pomegranate peel using spray drying method. *Foods* **10**, 1968.



- Šeremet, D., Subotić, P., Marković, K., Mandura Jarić, A., Vojvodić Cebin, A., Vahčić, N., Komes, D. (2023) Development, bioactive and sensory analysis of the honey-filled chocolate pralines infused with ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **18**, 49-54.
- Šeremet, D., Vugrinec, K., Petrović, P., Butorac, A., Kuzmić, S., Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Lovrić, M., Pjanović, R., Komes, D. (2022) Formulation and characterization of liposomal encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plant mountain germander (*Teucrium montanum* L.) for the incorporation into coffee drinks. *Food Chemistry* **370**, 131257.
- Šturm, L., Poklar Ulrih, N. (2021) Basic methods for preparation of liposomes and studying their interactions with different compounds, with the emphasis on polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 6547.
- Taib, I.S., Budin, S.B., Siti Nor Ain, S.M., Mohamed, J., Louis, S.R., Das, S., Sallehudin, S., Rajab, N.F., Hidayatulfathi, O. (2009) Toxic effects of *Litsea elliptica* Blume essential oil on red blood cells of Sprague-Dawley rats. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **10**, 813-819.
- Tan, T.Y.C., Lim, X.Y., Yeo, J.H.H., Lee, S.W.H., Lai, N.M. (2021) The health effects of chocolate and cocoa: A systematic review. *Nutrients* **13**, 2909.
- Tan, C., McClements, D.J. (2021) Application of advanced emulsion technology in the food industry: A review and critical evaluation. *Foods* **10**, 812.
- Tamtürk, F., Gürbüz, B., Toker, Ö.S., Dalabasmaz, S., Malakjani, N., Durmaz, Y., Konar, N. (2023) Optimization of *Chlorella vulgaris* spray drying using various innovative wall materials. *Algal Research* **72**, 103115.
- Taylor, D.A. (2005) Innovative Technologies: Sweet deal for cocoa production? *Environmental Health Perspectives* **113**, A516.
- Theunissen, S., Schumacker, J., Guerreo, F., Tillmans, F., Boutros, A., Lambrechts, K., Mazur, A., Pieri, M., Germonpré, P., Balestra, C. (2013) Dark chocolate reduces endothelial dysfunction after successive breath-hold dives in cool water. *European Journal of Applied Physiology* **113**, 2967-2975.



- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* **27**, 502-520.
- Timilsena, Y.P., Haque, M.A., Adhikari, B. (2020) Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. *Food and Nutrition Sciences* **11**, 481-508.
- Tobyn, G., Denham, A., Whitelegg, M. (2011) *The Western Herbal Tradition*, Elsevier Ltd.
- Toledo Hijo, A.A.C., Da Costa, J.M.G., Silva, E.K., Azevedo, V.M., Yoshida, M.I., Borges, S.V. (2014) Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles. *Journal of Food Process Engineering* **38**, 1-10.
- Tomescu, A., Rus, C., Pop, G., Alexa, E., Radulov, I., Imbrea, I.M., Negrea, M. (2015) Researches regarding proximate and selected elements composition of some medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Lucrări Științifice* **58**, 175-180.
- Tolve, R., Condelli, N., Caruso, M.C., Barletta, D., Favati, F., Galgano, F. (2018) Fortification of dark chocolate with microencapsulated phytosterols: chemical and sensory evaluation. *Food & Function* **9**, 1265-1273.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D. (2008) Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering* **88**, 411-418.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D. (2010) Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* **43**, 907-914.
- Torbica, A., Jovanovic, O., Pajin, B. (2006) The advantages of solid fat content determination in cocoa butter and cocoa butter equivalents by the Karlshamns method. *European Food Research and Technology* **222**, 385-391.
- Torkamami, A.E., Syahariza, Z.A., Norziah, M.H., Wan, A.K.M., Juliano, P. (2018) Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from *Momordica charantia* fruit within zein/gelatin shell core fibers via coaxial electrospinning. *Food Science* **21**, 60-71.
- Torres-Moreno, M., Tarrega, A., Costell, E., Blanch, C. (2012a) Dark chocolate acceptability: Influence of cocoa origin and processing conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**, 404-411.



- Torres-Moreno, M., Tarrega, A., Torrecasana, E., Blanch, C. (2012b) Influence of label information on dark chocolate acceptability. *Appetite* **58**, 665-671.
- Trading Economics (2024) Commodities, <<https://tradingeconomics.com/commodities>>. Pristupljeno 25. veljače 2024.
- Tripathy, S., Srivastav, P.P. (2023) Encapsulation of *Centella asiatica* leaf extract in liposome: Study on structural stability, degradation kinetics and fate of bioactive compounds during storage. *Food Chemistry Advances* **2**, 100202.
- Trumbetić, D., Kosalec, I. (2019) Europska regulativa biljnih i tradicionalnih biljnih lijekova. *Farmaceutski glasnik* **75**, 207-218.
- Tuenter, E., Foubert, K., Pieters, L. (2018) Model components in cocoa and chocolate: The mood pyramid. *Planta Medica* **84**, 839-844.
- Urbańska, B., Derewiaka, D., Lenart, A., Kowalska, J. (2019) Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. *European Food Research and Technology* **245**, 2101-2112.
- Uredba (EZ) br. 1924/2006 Europskog parlamenta i vijeća od 20. prosinca 2006.
- Uredba Komisije (EU) 2015/539 od 31. ožujka 2015.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* **266**, 37-56.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E. (2021) Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms* **9**, 2041.
- Varga, L., Engel, R., Szabó, K., Abrankó, L., Gosztola, B., Németh, É.Z., Sárosi, S. (2016) Seasonal variation in phenolic content and antioxidant activity of *Glechoma hederacea* L. harvested from six Hungarian populations. *Acta Alimentaria* **45**, 268-276.
- Velderrain-Rodríguez, G.R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J.F., Chen, C.Y.O., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (2014) Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food & Function* **5**, 189-197.



- Verma, D., Sharma, S.K. (2021) Recent advances in guar gum based drug delivery systems and their administrative routes. *International Journal of Biological Macromolecules* **181**, 653-671.
- Verreault, D., Rousseau, G. M., Gendron, L., Massé, D., Moineau, S., Duchaine, C. (2010) Comparison of polycarbonate and polytetrafluoroethylene filters for sampling of airborne bacteriophages. *Aerosol Science and Technology* **44**, 197-201.
- Vihnanek Lazarus, M., Sekovanić, A., Kljaković-Gašpić, A., Orct, T., Jurasović, J., Kusak, J., Reljić, S., Huber, Đ. (2013) Cadmium and lead in grey wolf liver samples: optimisation of a microwave-assisted digestion method. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **64**, 395-403.
- Vimercati, W.C., Araújo, C.S., Macedo, L.L., Gomes Correa. J.L., Pimenta, C.J. (2022) Encapsulation of coffee silverskin extracts by foam mat drying and comparison with powders obtained by spray drying and freeze-drying. *Journal of Food Science* **87**, 1767-1779.
- Vítová, E., Loupancová, B., Štoudková, H., Macku, I., Zemanová, J., Babák, L. (2009) Effect of fat composition on some physico-chemical parameters and sensorial evaluation of dark chocolate. *Journal of Food and Nutrition Research* **48**, 72-79.
- Vlachopoulos, C., Aznaouridis, K., Alexopoulos, N., Economou, E., Andreadou, I., Stefanadis, C. (2005) Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *American Journal of Hypertension* **18**, 785-791.
- Vladislavljevic, G. (2015) Encapsulation application. U: *Encyclopedia of Membranes* (Driol, E., Giorno, L., ured.), Springer (objavljeno online 1. siječnja 2015.). doi: 10.1007/978-3-642-40872-4_879-5.
- Vostálová, J., Zdarilová, A., Svobodová, A.R. (2009) *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* **302**, 171-181.
- Wang, D.Y., van der Mei, H.C., Ren, Y., Busscher, H.J., Shi, L. (2020) Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Chemistry* **7**, 872.



- Wang, J.Z., Ding, Z.Q., Zhang, F., Ye, W.B. (2017b) Recent development in cell encapsulations and their therapeutic applications. *Materials Science and Engineering C* **77**, 1247-1260.
- Wang, W., Hause, B., Peumans, W.J., Smagghe, G., Mackie, A., Fraser, R., Van Damme, E.J.M. (2003) The Tn antigen-specific lectin from ground ivy is an insecticidal protein with an unusual physiology. *Plant Physiology* **132**, 1322-1334.
- Wang, Y.Y., Lin, S.Y., Chen, W.Y., Liao, S.L., Wu, C.C., Pan, P.H., Chou, S.T., Chen, C.J. (2017a) *Glechoma hederacea* extracts attenuate cholestatic liver injury in a bile duct-ligated rat model. *Journal of Ethnopharmacology* **204**, 58-66.
- Wearley, L.L. (1991) Recent progress in protein and peptide delivery by noninvasive routes. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **8**, 331-394.
- Weaver, C.M. (2013) Potassium and health. *Advances in Nutrition* **4**, 368S-377S.
- WHO (2005) National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey. WHO - World Health Organization, Ženeva.
- Wickramasuriya, A.M., Dunwell, J.M. (2018) Cacao biotechnology: Current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal* **16**, 4-17.
- Wijaya, W., Zheng, H., Zheng, T., Su, S., Patel, A.R., Van der Meeren, P., Huang, Q. (2020) Improved bioaccessibility of polymethoxyflavones loaded into high internal phase emulsions stabilized by biopolymeric complexes: A dynamic digestion study via TNO's gastrointestinal model. *Current Research in Food Science* **2**, 11-19.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* **33**, 423-447.
- Xiao, M., Yang, M., Ji, X., Li, D., Xie, Y., Lyu, Y., Zuo, Z. (2021) Protective effect of *Glechoma hederacea* extract against gallstone formation in rodent models. *BMC Complementary Medicine and Therapies* **21**, 199.
- Yamauchi, H., Kakuda, R., Yaoiza, Y., Machida, K., Kikuchi, M. (2007) Two new glycosides from the whole plants of *Glechoma hederacea* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **55**, 346-347.



- Yan, C., Tian, D., Zhang, C., Zhang, Q., Sun, Y. (2023) Evaluation of blood cellular and biochemical parameters in rats under a chronic hypoxic environment at high altitude. *Annals of Medicine* **55**, 898-907.
- Yang, J.H., Zhang, L., Li, J.S., Chen, L.H., Zheng, Q., Chen, T., Chen, Z.P., Fu, T.M., Di, L.Q. (2015) Enhanced oral bioavailability and prophylactic effects on oxidative stress and hepatic damage of an oil solution containing a rosmarinic acid-phospholipid complex. *Journal of Functional Foods* **19**, 63-73.
- Yoon, J., Yang, H.S., Lee, B.S., Yu, W.R. (2018) Recent progress in coaxial electrospinning: New parameters, various structures, and wide applications. *Advanced Materials* **30**, 1704765.
- Yoon, S.J., Chu, D.C., Juneja, L.R. (2008) Chemical and physical properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **42**, 1-7.
- Yoroba, F., Kouassi, B.K., Diawara, A., Yapo, L.A.M., Kouadio, K., Tiemoko, D.T., Kouadio, Y.K., Koné, I.D., Assamoi, P. (2019) Evaluation of rainfall and temperature conditions for a perennial crop in tropical wetland: A case study of cocoa in Côte d'Ivoire. *Advances in Meteorology* **2019**, 1-11.
- Younus, H. (2018) Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences* **12**, 88-93.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. (2016) The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* **21**, 1-18.
- Yuan, S., Li, X., Jin, Y., Lu, J. (2017) Chocolate consumption and risk of coronary heart disease, stroke, and diabetes: A meta-analysis of prospective studies. *Nutrients* **9**, 688.
- Yücel, Ç., Karatoprak, G., Değim, I.T. (2019) Anti-aging formulation of rosmarinic acid-loaded ethosomes and liposomes. *Journal of Microencapsulation* **36**, 180-191.
- Zaias, J., Mineau, M., Cray, C., Yoon, D., Altan, N.H. (2009) Reference values for serum proteins of common laboratory rodent strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **48**, 387-390.
- Zakon o lijekovima (2013) *Narodne novine* **76**, Zagreb.
- Zakon o zaštiti životinja (2017) *Narodne novine* **102**, Zagreb.



- Zanoni, F., Primiterra, M., Angeli, N., Zoccatelli, G. (2019) Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: Effects on stability and color properties. *Food Chemistry* **307**, 125535.
- Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejin, A., Elgndi, M.A., Pavlić, B. (2014) Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids* **95**, 560-566.
- Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejin, A., Elgndi, M.A., Pavlić, B. (2014) Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids* **95**, 560-566.
- Zhang, B., Zheng, L., Liang, S., Lu, Y., Zheng, J., Zhang, G., Li, W., Jiang, H. (2022) Encapsulation of capsaicin in whey protein and OSA-modified starch using spray-drying: Physicochemical properties and its stability. *Foods* **11**, 612.
- Zhang, H., Tsao, R. (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* **8**, 33-42.
- Zhang, G., Zhang, M., Pei, Y., Qian, K., Xie, J., Huang, Q., Liu, S., Xue, N., Zu, Y., Wang, H. (2023) Enhancing stability of liposomes using high molecular weight chitosan to promote antioxidative stress effects and lipid-lowering activity of encapsulated lutein *in vivo* and *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules* **253**, 126564.
- Zhang, H., Zhang, L., Sun, X., Xie, S. (2015) Chapter 1 – Applications of low-field pulsed nuclear magnetic resonance technique in lipid and food. U: *Applications of NMR Spectroscopy* (ur-Rahman, A., Choudhary, M. I., ured.), Bentham Science Publishers, Elsevier, Amsterdam, str. 3-56.
- Zhang, H.F., Yang, X.H., Wang, Y. (2011) Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology* **22**, 672-688.
- Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H. (2019) Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. *Trends in Food Science & Technology* **95**, 183-195.



- Zhang, Y., Yang, Y., Ye, J., Gao, Y., Liao, H., Zhou, J., Feng, Y., Liu, D., Meng, Y., Chen, X., Gao, L., Liu, Y. (2021) Construction of chlorogenic acid-containing liposomes with prolonged antitumor immunity based on T cell regulation. *Science China Life Sciences* **64**, 1097-1115.
- Zhao, W., Zhuang, S., Qi, X.R. (2011) Comparative study of the *in vitro* and *in vivo* characteristics of cationic and neutral liposomes. *International Journal of Nanomedicine* **6**, 3087-3098.
- Zhou, H., Zheng, B., McClements, D.J. (2021) Encapsulation of lipophilic polyphenols in plant-based nanoemulsions: impact of carrier oil on lipid digestion and curcumin, resveratrol and quercetin bioaccessibility. *Food & Function* **8**, 3420-3432.
- Zhou, Y., He, Y.J., Wang, Z.J., Hu, B.Y., Xie, T.Z., Xiao, X., Zhou, Z.S., Sang, X.Y., Luo, Y.D. (2021) A review of plant characteristics, phytochemistry and bioactivities of the genus *Glechoma*. *Journal of Ethnopharmacology* **271**, 113830.
- Zinicovscaia, I., Gundorina, S., Vergel, K., Grozdov, D., Ciocarlan, A., Aricu, A., Dragalin, I., Ciocarlan, N. (2020) Elemental analysis of Lamiaceae medicinal and aromatic plants growing in the Republic of Moldova using neutron activation analysis. *Phytochemistry Letters* **35**, 119-127.
- Zorilla, J.G., Giovannini, O., Nadalini, S., Zanini, A., Russo, M.T., Masi, M., Puopolo, G., Cimmino, A. (2023) Suppressive activity of *Glechoma hederacea* extracts against the phytopathogenic oomycete *Plasmopara viticola*, and first screening of the active metabolites. *Agriculture* **14**, 58.
- Żyżelewicz, D., Oracz, J., Bilicka, M., Kulbat-Warycha, K., Klewicka, E. (2021) Influence of freeze-dried phenolic-rich plant powders on the bioactive compounds profile, antioxidant activity and aroma of different types of chocolates. *Molecules* **26**, 7058.






ŽIVOTOPIŠ

Danijela Šeremet rođena je 13. siječnja 1994. godine u Zaboku u Republici Hrvatskoj. Pohađala je Srednju školu Zlatar, smjer opća gimnazija, gdje je maturirala 2012. godine. Akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke prehrambene tehnologije stekla je 2016. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2018. godine diplomirala je na istome fakultetu i stekla akademski naziv magistre inženjerke prehrambenog inženjerstva. Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2019. godine. Tečaj za osposobljavanje voditelja pokusa i njegova zamjenika (LabAnim B kategorija) po Programu osposobljavanja osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka (OSP 191/001) završila je 2021. godine.

Od studenog 2018. godine radi kao asistentica u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda (Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje sudjeluje u izvođenju nastave na prijediplomskim i diplomskim studijima. Bila je suradnica na 2 završena nacionalna projekta financiranim sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, a trenutno je suradnica na 1 takvom projektu i 1 međunarodnom popularizacijskom projektu u sklopu Erasmus+ programa. Sudjelovala je također u 3 bilateralna projekta (hrvatsko-slovenska, -srpska i -kineska bilateralna).

Koautorica je sveukupno 19 znanstvenih radova indeksiranih prema Web of Science Core Collection/Current Contents, 6 znanstvenih radova indeksiranih u sekundarnim publikacijama i 6 znanstvenih radova u domaćim i međunarodnim zbornicima. Također, autorica je 2 poglavlja u znanstvenim monografijama. Trenutni h-indeks iznosi 6.


Od 2019. godine, svake godine, sudjeluje u organizaciji stručnog skupa „Funkcionalna hrana u Hrvatskoj“, a 2022. godine sudjelovala je kao članica znanstvenog odbora u organizaciji međunarodnog kongresa „10th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists“ u Zagrebu. Dobitnica je nagrade „Potpora Biotehničke zaklade“ Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za 2020. godinu, kao i nagrade „Godišnja nagrada Društva mladim znanstvenicima i umjetnicima“ za 2023. godinu koju dodjeljuje Društvo sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu.







Popis radova

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u Web of Science Core Collection/Current Contents

1. **Šeremet, D.**, Žižek, K., Žepić, I., Kovačević, M., Nižić Nodilo, L., Vrsaljko, D., Katančić, Z., Sokač, K., Kuzmić, S., Komes, D. (2024) Effect of guar gum-based carriers on the physical and bioactive properties of spray-dried delivery systems of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). *Food Hydrocolloids* **150**, 109658.
 2. Mandura Jarić, A., Haramustek, L., Nižić Nodilo, L., Vrsaljko, D., Petrović, P., Kuzmić, S., Jozinović, A., Aladić, K., Jokić, S., **Šeremet, D.**, Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2024) A novel approach to serving plant-based confectionery - The employment of spray drying in the production of carboxymethyl cellulose-based delivery systems enriched with *Teucrium montanum* L. extract. *Foods* **13**, 372.
 3. Vojvodić Cebin, A., Bunić, M., Mandura Jarić, A., **Šeremet, D.**, Komes, D. (2023) Physicochemical and sensory stability evaluation of gummy candies fortified with mountain germander extract and prebiotics. *Polymers* **16**, 259.
 4. **Šeremet, D.**, Durgo, K., Kosanović, J., Huđek Turković, A., Mandura Jarić, A., Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2023) Studying the functional potential of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract using *in vitro* methodology. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 16975.
 5. Mandura Jarić, A., Čikoš, A., Pocrnić, M., Aladić, K., Jokić, S., **Šeremet, D.**, Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2023) *Teucrium montanum* - Unrecognized source of phenylethanoid glycosides: green extraction approach and elucidation of phenolic compounds via NMR and UHPLC-HR MS/MS. *Antioxidants* **12**, 1903.
 6. **Šeremet, D.**, Durgo, K., Komljenović, A., Antolić, M., Mandura Jarić, A., Huđek Turković, A., Komes, D., Šantek, B. (2022) Red beetroot and banana peels as value-added ingredients: assessment of biological activity and preparation of functional edible films. *Polymers* **14**, 4724.
 7. **Šeremet, D.**, Štefančić, M., Petrović, P., Kuzmić, S., Doroci, S., Mandura Jarić, A., Vojvodić Cebin, A., Pjanović, R., Komes, D. (2022) Development, characterization and incorporation of alginate-plant protein covered liposomes containing ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract into candies. *Foods* **11**, 1816.
 8. **Šeremet, D.**, Jokić, S., Aladić, K., Butorac, A., Lovrić, M., Jurinjak Tušek, A., Obranović, M., Mandura Jarić, A., Vojvodić Cebin, A., Carović-Stanko, K., Komes, D. (2022) Comprehensive study of traditional plant ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) grown in Croatia in terms of nutritional and bioactive composition. *Foods* **11**, 658.
 9. **Šeremet, D.**, Fabečić, P., Vojvodić Cebin, A., Mandura Jarić, A., Pudić, R., Komes, D. (2022) Antioxidant and sensory assessment of innovative coffee blends of reduced caffeine content. *Molecules* **27**, 448.
- 

- 
10. **Šeremet, D.**, Vugrinec, K., Petrović, P., Butorac, A., Kuzmić, S., Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Lovrić, M., Pjanović, R., Komes, D. (2022) Formulation and characterization of liposomal encapsulated systems of bioactive ingredients from traditional plant mountain germander (*Teucrium montanum* L.) for the incorporation into coffee drinks. *Food Chemistry* **370**, 131257.
 11. Mandura Jarić, A., **Šeremet, D.**, Vojvodić Cebin, A., Jokić, S., Komes, D. (2021) The multiple-response modeling of heat-assisted, microwave-assisted and subcritical water extraction on selected phenolics from traditional plant species *Teucrium montanum*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **52**, 1-13.
 12. **Šeremet, D.**, Jokić, S., Aladić, K., Vojvodić Cebin, A., Božac, N., Mandura, A., Komes, D. (2021) Optimization of heat-, microwave-assisted and subcritical water extraction of phenolic compounds from ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **25**, 100346.
 13. **Šeremet, D.**, Karlović, S., Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Ježek, D., Komes, D. (2021) Extraction of bioactive compounds from different types of tea by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Processing and Preservation* **45**, 9, e15751.
 14. Osojnik Črnivec, I.G., Skrt, M., **Šeremet, D.**, Sterniša, M., Farčnik, D., Štrumbelj, E., Poljanšek, A., Cebin, N., Pogačnik, L., Možina, Sonja Smole, Komes, D. (2021) Waste streams in onion production: bioactive compounds, quercetin and use of antimicrobial and antioxidative properties. *Waste Management* **126**, 476-486.
 15. **Šeremet, D.**, Mandura, A., Vojvodić Cebin, A., Martinić, A., Galić, K., Komes, D. (2020) Challenges in confectionery industry: development and storage stability of innovative white tea-based candies. *Journal of Food Science* **85**, 2060-2068.
 16. **Šeremet, D.**, Durgo, K., Jokić, S., Huđek, A., Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Jurasović, J., Komes, D. (2020) Valorization of banana and red beetroot peels: determination of basic macrocomponent composition, application of novel extraction methodology and assessment of biological activity *in vitro*. *Sustainability* **12**, 4539.
 17. Mandura, A., **Šeremet, D.**, Ščetar, M., Vojvodić Cebin, A., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D. (2020) Physico-chemical, bioactive, and sensory assessment of white tea-based candies during 4-months storage. *Journal of Food Processing and Preservation* **44**, e14628.
 18. Režek Jambrak, A., Ojha, S., **Šeremet, D.**, Nutrizio, M., Maltar-Strmečki, N., Valić, S., Gajdoš Kljusurić, J., Tiwari, B. (2020) Free radical detection in water after processing by means, of high voltage electrical discharges and high power ultrasound. *Journal of Food Processing and Preservation*, **45**, e15176.
 19. Karača, S., Trifković, K., Martinić, A., Đorđević, V., **Šeremet, D.**, Cebin, A.V., Bugarski, B., Komes, D. (2019) Development and characterisation of functional cocoa (*Theobroma cacao* L.)-based edible films. *International Journal of Food Science and*
- 

Poglavlja u znanstvenim monografijama

1. Komes, D., **Šeremet, D.**, Mandura, A., Vojvodić Cebin, A. (2021) Valorizacija bioaktivnog potencijala nusproizvoda kave. *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 3* (Šubarić, D., Miličević, B., ur.), Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet, str. 207-237.
2. Komes, D., **Šeremet, D.** (2019) Sekundarne biljne sirovine kao izvor funkcionalnih sastojaka u sastavu inkapsuliranih bioaktivnih formulacija. *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 2* (Šubarić, D., Babić, J., ur.), Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet, str. 15-36.

Radovi indeksirani u sekundarnim publikacijama

1. **Šeremet, D.**, Subotić, P., Marković, K., Mandura Jarić, A., Vojvodić Cebin, A., Vahčić, N., Komes, D. (2023) Development, bioactive and sensory analysis of the honey-filled chocolate pralines infused with ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **18**, 49-54.
2. **Šeremet, D.**, Vojvodić Cebin, A., Mandura Jarić, A., Komes, Draženka (2021) Valorisation of *Teucrium montanum* as a source of valuable natural compounds: Bioactive content, antimicrobial and biological activity – A review. *Pharmacognosy reviews* **15**, 191-198.
3. Mandura, A., Pasquino Natucci, M., Cazalens, E., **Šeremet, D.**, Pudić, R., Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2021) The assessment of bioactive potential and sensory acceptability of coffee and its byproducts - cascara and silverskin. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **16**, 35-40.
4. Vukušić Pavičić, T., **Šeremet, D.**, Maltar-Strmečki, N., Stulić, V., Zorić, Z., Herceg, Z. (2020) Impact of heat-assisted HVED plasma treatment on quality of apple juice. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **15**, 107-114.
5. **Šeremet, D.**, Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Žepić, I., Marković, K., Komes, D. (2020) An insight into the chemical composition of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) by means of macrocomponent analysis and fractionation of phenolic compounds. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **15**, 133-138.
6. **Šeremet, D.**, Mandura, A., Vojvodić Cebin, A., Oskomić, M., Champion, E., Martinić, A., Komes, D. (2019) Ruby chocolate - bioactive potential and sensory quality characteristics compared with dark, milk and white chocolate. *Hrana u zdravlju i bolesti* **8**, 89-96.

Radovi u domaćim i međunarodnim zbornicima

1. Mandura Jarić, A., Miletić, L., Kuzmić, S., Sander, A., **Šeremet, D.**, Vojvodić Cebin, A., Komes, D. (2023) Electrospun nanofibres as an emerging delivery system for phenylethanoid glycosides: preparation and *in vitro* evaluation. *Proceedings - 10th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists* (Komes, D., Vidaček Filipec, S., Voučko, B., ur.), Zagreb, Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, str. 5-9.
2. Balanč, B., Halagi, J., Skrobonja, J., Milivojević, A., **Šeremet, D.**, Komes, D., Pjanović, R. (2023) Encapsulation of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract, obtained by natural deep eutectic solvents extraction, in liposomes. *Proceedings - 10th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists* (Komes, D., Vidaček Filipec, S., Voučko, B., ur.), Zagreb, Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, str. 10-13.
3. **Šeremet, D.**, Mandura, A., Vojvodić Cebin, A., Jokić, S., Komes, D. (2021) Development and characterization of dopamine-loaded liposomes extracted from banana peel. *Proceedings - 18th Ružička Days "Today Science – Tomorrow Industry"* (Jukić, A., Ocelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D., ur.), Zagreb i Osijek, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI) i Prehrambeno tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 132-140.
4. **Šeremet, D.**, Mandura, A., Vojvodić Cebin, A., Jokić, S., Komes, D. (2021) Influence of conventional and innovative extraction techniques on bioactive properties of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). *Proceedings - 18th Ružička Days "Today Science – Tomorrow Industry"* (Jukić, A., Ocelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D., ur.), Zagreb i Osijek, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI) i Prehrambeno tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 125-131.
5. Pjanović, R., Pravilović, R., Banković, K., Milivojević, M., **Šeremet, D.**, Komes, D. (2020) Nanoparticles niosomes as a vectors for delivery of hydrophilic compounds. *Proceedings of 9th International Scientific Conference on Defensive Technologies* (Lisov, M., Radović, Lj., ur.), Beograd, The Military Technical Institute, str. 518-520.
6. Vukušić, T., **Šeremet, D.**, Stulić, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2018) Possible application of high voltage electrical discharge plasmas in fruit juice processing? *Proceedings of the 22nd International Conference on Gas Discharges and Their Application* (Petrović, Z., Puač, N., Dujko, S. i sur., ur.). Beograd, Srpska akademija nauka i umetnosti (SANU), str. 571-574.