

Razvoj i karakterizacija čokolada obogaćenih liposomalnim inkapsulatom polifenolnih spojeva haritakija (*Terminalia chebula* Retz.)

Budimir, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

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:159:155411>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpnja 2024.

Iva Budimir

**RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA ČOKOLADA
OBOGAĆENIH LIPOSOMALNIM
INKAPSULATOM POLIFENOLNIH
SPOJEVA HARITAKIJA (*Terminalia
chebula* Retz.)**

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

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem prof. dr. sc. Draženki Komes na lijepim riječima, savjetima te razumijevanju prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Također, veliko hvala asistentici dr. sc. Danijeli Šeremet na iznimnoj podršci, ohrabrenju, strpljivosti i prenesenom znanju! Hvala i ostalim članovima Laboratorija za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na ugodnoj radnoj atmosferi te ostalim djelatnicima fakulteta koji su ustupili svoje uređaje za izradu ovog rada.

Najviše se zahvaljujem svojim roditeljima na podršci, razumijevanju i ljubavi od samih početaka školovanja do danas. Hvala i mom bratu Vedranu, dečku Josipu, ostatku obitelji i svim prijateljima koji su bili uz mene na ovom putu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA ČOKOLADA OBOGAĆENIH LIPOSOMALNIM INKAPSULATOM
POLIFENOLNIH SPOJEVA HARITAKIJA (*Terminalia chebula* Retz.)

Iva Budimir, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213756

Sažetak: Cilj ovog rada bio je formulacija liposomalnih dozirnih sustava polifenolnih spojeva ekstrakta haritakija (*Terminalia chebula* Retz.) te njihova inkorporacija u čokoladu u svrhu razvoja funkcionalnog konditorskog proizvoda. Formuliranim liposomalnim sustavima određena su fizikalna (veličina, indeks polidisperzije i zeta potencijal) i bioaktivna (inkapsulacijska učinkovitost i simulirana digestija) svojstva, a novoformuliranim čokoladama (sa i bez dodatka 10 % liposomalnog inkapsulata) bioaktivna, reološka, teksturalna, fizikalna i senzorska svojstva. Liposomalna inkapsulacija rezultirala je visokom učinkovitošću inkapsulacije ukupnih polifenola (97,2 %) i omogućila je njihovo kontinuirano i kontrolirano otpuštanje u uvjetima simulirane probave. Dodatak liposomalnog inkapsulata haritakija značajno je ($p < 0,05$) utjecao na povećanje medijana volumne raspodjele i reoloških parametara (Casson-ove granice tečenja i viskoznosti) čokolade, dok se njihova tvrdoća i maksimalna temperatura taljenja nisu značajno ($p > 0,05$) promijenile. Rezultati senzorske analize čokolada potvrdili su da je provedena dobra homogenizacija liposomalnog inkapsulata unutar matriksa čokolade te da je biljni okus haritakija uspješno zamaskiran inkorporacijom u čokoladu u inkapsuliranom obliku.

Ključne riječi: haritaki, liposomi, inkapsulacija, funkcionalna čokolada, polifenoli

Rad sadrži: 52 stranice, 17 slika, 11 tablica, 127 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: dr. sc. Danijela Šeremet

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Marković (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Draženka Komes (mentor)
3. doc. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjenski član)

Datum obrane: 16. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CHOCOLATE ENRICHED WITH LIPOSOMAL ENCAPSULATE OF POLYPHENOL COMPOUNDS OF HARITAKI (*Terminalia chebula* Retz.)

Iva Budimir, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213756

Abstract: The aim of the present study was to formulate liposomal delivery systems for the polyphenolic compounds of haritaki extract (*Terminalia chebula* Retz.) and incorporate them into chocolate to develop functional confectionery product. The formulated liposomal systems were characterized by their physical and bioactive properties, while the newly formulated chocolates (with and without the addition of 10 % liposomal encapsulate) were characterized by their bioactive, rheological, textural, physical and sensory properties. The liposomal encapsulation technique resulted in a high encapsulation efficiency for total polyphenols (97.2 %) and enabled their continuous and controlled release under simulated digestion conditions. The addition of haritaki liposomal encapsulation system in the chocolate significantly affected the increase in the median volume distribution, rheological parameters, while hardness and maximum melting temperature were not significantly altered. The results of sensory analysis of chocolate confirmed a good homogenization of the liposomal encapsulate in the chocolate matrix, while the herbal taste of haritaki was successfully masked.

Keywords: haritaki, liposomes, encapsulation, functional chocolate, polyphenols

Thesis contains: 52 pages, 17 figures, 11 tables, 127 references, 00 supplements

Original in: Croatia

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

Mentor: Draženka Komes, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Danijela Šeremet, PhD

Reviewers:

1. Ksenija Marković, PhD, Full professor (president)
2. Draženka Komes, PhD, Full professor (mentor)
3. Aleksandra Vojvodić Cebin PhD, Assistant professor (member)
4. Ksenija Durgo PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 16th 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. HARITAKI (<i>Terminalia chebula</i> Retz)	2
2.1.1. Bioaktivni spojevi haritakija	3
2.1.2. Biološko djelovanje haritakija	3
2.2. INKAPSULACIJA	6
2.2.1. Liposomalna inkapsulacija	7
2.2.2. Metabolizam polifenola i utjecaj inkapsulacije na njihovu bioraspoloživost	10
2.3 ČOKOLADA	11
2.3.1. Proizvodnja i konzumacija čokolade.....	11
2.3.2. Čokolada kao funkcionalna hrana	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. UZORCI	18
3.2. KEMIKALIJE	18
3.3. SIROVINE ZA PRIPREMU ČOKOLADE	19
3.4. LABORATORIJSKA OPREMA	19
3.5. METODE	20
3.5.1. Karakterizacija sastava ekstrakta haritakija	20
3.5.1.1. Određivanje udjela suhe tvari	20
3.5.1.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	20
3.5.1.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	20
3.5.1.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	20
3.5.1.5. Određivanje udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	21
3.5.2. Liposomalna inkapsulacija polifenolnih spojeva haritakija	21
3.5.2.1. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti.....	22
3.5.2.2. Određivanje fizikalnih parametara liposoma	22
3.5.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta TBARS metodom	22
3.5.2.4. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola iz liposoma u uvjetima simulirane probave.....	22
3.5.3. Formulacija čokolada	23
3.5.3.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolade	23
3.5.3.2. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola iz čokolada u uvjetima simulirane probave.....	24
3.5.3.3. Određivanje reoloških svojstava čokolade.....	24
3.5.3.4. Određivanje raspodjele veličine čestica.....	24

3.5.3.5. Određivanje teksturalnih svojstava čokolada.....	24
3.5.3.6. Određivanje svojstava taljenja čokolada.....	25
3.5.3.7. Senzorska analiza čokolada.....	25
3.5.4. Statistička obrada rezultata	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA HARITAKIJA.....	26
4.2. LIPOSOMALNA INKAPSULACIJA	28
4.2.1. Fizikalna karakterizacija liposoma	28
4.2.2. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti.....	29
4.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta TBARS metodom.....	31
4.2.4. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave.....	31
4.3. FORMULACIJA ČOKOLADA.....	32
4.3.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada	32
4.3.2. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola čokolada u uvjetima simulirane probave ..	34
4.3.3. Raspodjela veličine čestica u uzorcima čokolada	34
4.3.4. Određivanje reoloških svojstava čokolade.....	36
4.3.5. Određivanje tvrdoće čokolada	37
4.3.6. Određivanje svojstava taljenja čokolade.....	38
4.3.7. Određivanje senzorskih svojstava čokolada	39
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA.....	43

1. UVOD

U posljednjih nekoliko godina pojavljuje se rastuća potražnja potrošača za funkcionalnom hranom što je posljedica njihove povećane svijesti o zdravlju, ekološkoj održivosti i želji za povratkom prirodnim i manje prerađenim prehrambenim proizvodima. Također, potrošači su sve više informirani o zdravstvenim aspektima funkcionalne hrane, posebice one koja sadrži bioaktivne spojeve podrijetlom iz tradicionalnih biljnih vrsta, čija konzumacija može rezultirati i određenim biološkim učincima.

Haritaki (*Terminalia chebula* Retz.) ima široku uporabu u tradicionalnoj medicini gdje se koristi za detoksikaciju, poboljšanje probave i jačanje imunološkog sustava. Navedena terapijska svojstva rezultat su prisutstva različitih bioaktivnih spojeva u haritakiju, naročito tanina, flavonoida, fenolnih kiselina, polisaharida, terpena te esencijalnih mineralnih tvari. S obzirom na to da su neki bioaktivni spojevi, naročito polifenolni spojevi, osjetljivi na razne vanjske uvjete (prisutnost svjetla i kisika, visoka temperatura, itd.), kao i uvjete u probavnom sustavu te imaju nisku biodostupnost i gorak okus, razvijene su različite tehnike inkapsulacije koje nadilaze navedene prepreke i omogućuju njihovu širu primjenu.

Inkapsulacija se odnosi na proces u kojem se biološki aktivni spojevi smještaju unutar ili oblažu sustavom nosača formirajući mikročestice ili kapsule koje omogućuju ciljano i kontrolirano otpuštanje aktivnih spojeva u organizmu. U farmaceutskoj industriji, a u posljednje vrijeme i u prehrambenoj, istražuje se mogućnost primjene liposomalne inkapsulacije pošto amfifilna svojstva liposoma pogoduju inkapsulaciji i hidrofилnih i hidrofobnih spojeva.

Zbog svoje popularnosti među potrošačima i rastuće potražnje na tržištu, čokolada je poželjan prehrambeni matriks za obogaćivanje funkcionalnim sastojcima.

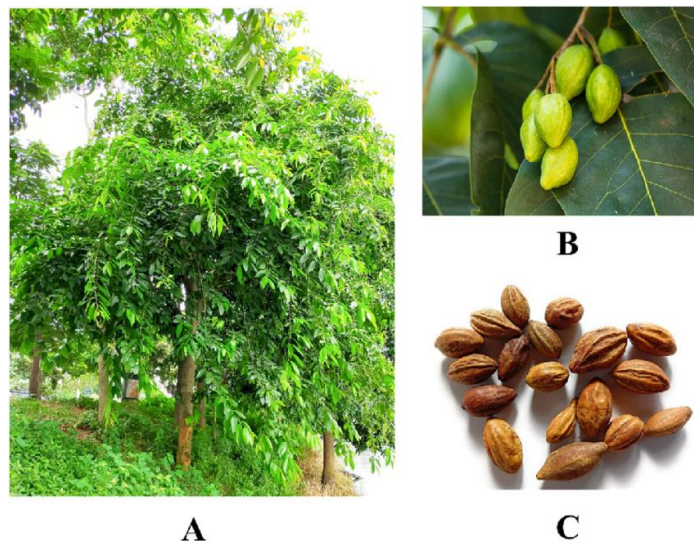
Ciljevi ovog rada su bili:

- karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakta haritakija određivanjem udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta te udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva
- inkapsulacija ekstrakta tehnikom liposomalne inkapsulacije te bioaktivna i fizikalna karakterizacija formuliranih liposomalnih sustava
- formulacija čokolade obogaćene dodatkom liposomalnog inkapsulata haritakija te karakterizacija njenih bioaktivnih, reoloških, fizikalnih, teksturalnih i senzorskih svojstava.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HARITAKI (*Terminalia chebula* Retz)

Rod *Terminalia* iz porodice Combretaceae obuhvaća 200 – 250 biljnih vrsta. Vrste iz roda *Terminalia* široko su rasprostranjene u južnoj Aziji, Australiji te tropskim i suptropskim područjima Afrike (McGaw i sur., 2001). Naziv „*Terminalia*“ dolazi od latinske riječi „*terminus*“ što znači da se lišće nalazi na krajevima grana. Listovi su veliki i kožasti, 10 cm dugački i 6 cm široki, a cvjetovi su zeleno-bijele boje. Plodovi su koštunice, dugački 3,1 cm i široki 1,7 cm te su prisutni u žutoj, tamnocrvenoj i crnoj boji (slika 1). Plodovi pojedinih vrsta su jestivi i posjeduju različita ljekovita svojstva (Zhang i sur., 2019; Pathak i sur., 2019; Deshmukh i sur., 2013). Plodovi se konzumiraju sirovi, kao dekoka i u obliku praha (Gupta, 2012). *Terminalia chebula* Retz jedna je od farmakološki najistraženijih vrsta iz roda *Terminalia* te potječe iz jugoistočne i južne Azije (Nigam i sur., 2020). U Tibetu je prozvan „kraljem medicine“, a naziv „Haritaki“ posvećen je bogu Šivi (Hara) jer, prema legendi, otklanja sve bolesti (Bulbul i sur., 2022). Plodovi haritakija bogati su polifenolnim spojevima, uključujući fenolne kiseline, topljive tanine i flavonoide, a sadrže i vitamin C u visokom udjelu. Zbog svojih farmakoloških učinaka, kao što su antioksidacijsko, hepatoprotektivno, neuroprotektivno, citotoksično, antidijabetsko te protuupalno, haritaki je predmet proučavanja brojnih znanstvenih istraživanja (Nigam i sur., 2020). Na tržištu je dostupan kao samostalna biljka, u sirovom ili praškastom obliku, a često i kao sastavni dio tradicionalnog praškastog biljnog pripravka „Triphala“, koji uz haritaki, sadrži i plodove biljaka amalaki i bibhitaki (Gupta, 2012).



Slika 1. Stablo (A), plodovi i lišće (B) i suhi plodovi (C) haritakija (Pradeep i sur., 2022)

2.1.1. Bioaktivni spojevi haritakija

Plodovi haritakija sadrže visoki udio polifenolnih spojeva, uključujući fenolne kiseline, tanine i flavonoide. Do sada, u haritakiju je identificirano 30-ak polifenolnih spojeva haritakija koji su prikazani u tablici 1. Uz polifenolne spojeve, plodovi haritakija sadrže i visoki udio vitamina C ($1,12 \text{ mg g}^{-1}$) (Nigam i sur., 2019; Kubola i sur., 2011). Trenutno je u bazi podataka Web of Science (WoS, 2024) dostupno 58 radova na temu bioaktivnog sastava haritakija.

2.1.2. Biološko djelovanje haritakija

Akumulacijom slobodnih kisikovih radikala dolazi do oksidacijskog oštećenja molekule DNK, peroksidacije lipida, karbonilacije proteina te inaktivacije antioksidacijskih enzima u stanici. Ova stanja mogu dovesti do pojave kroničnih bolesti poput raka, upale, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze (Bulbul i sur., 2022).

Polifenoli u sastavu haritakija, mogu donirati vodik te tako stabilizirati ili eliminirati slobodne radikale (Chen i sur., 2011). Vodeni ekstrakt ploda haritakija zaustavlja razvoj oštećenja izazvanih starenjem štiteći stanice od oksidacijskog stresa (Mahesh i sur., 2009), a uz to, protein TCP-III, također prisutan u plodu haritakija, štiti stanice od napada slobodnih radikala (Srivastava i sur., 2012).

Pozitivno djelovanje haritakija dokazano je i kod dijabetesa u istraživanju Senthilkumar i Subramanian (2008) koji su objavili smanjenje razine glukoze u krvi štakora s dijabetesom, uslijed konzumacije 200 mg kg^{-1} tjelesne mase plodova haritakija kroz 30 dana. Lee i sur. (2017) istraživali su djelovanje spojeva haritakija u inhibiciji α -glukozidaze kvasca i intestinalne α -glukozidaze štakora i među analiziranim spojevima, 23-O-galoil-arjunolna kiselina ($IC_{50} = 21,7 \text{ }\mu\text{M}$) i 23-O-galoil-arjunol-28-O- β -D-glukopiranozil ester ($IC_{50} = 64,2 \text{ }\mu\text{M}$) pokazali su snažno inhibitorno djelovanje na α -glukozidazu kvasca.

Haritaki se tradicionalno koristi kao antikancerogeni lijek u Africi i Aziji, a preliminarno istraživanje koje su proveli Pellati i sur. (2013) pokazalo je da dekokt haritakija posjeduje kemoprotektivna svojstva zbog prisustva derivata galne kiseline. Galna kiselina pokazala je citotoksično djelovanje na različitim humanim staničnim linijama raka, kao što su humane stanične linije raka želuca i adenokarcinoma debelog crijeva.

Također, u radu Feng i sur. (2021) dokazano je da čebulinska kiselina, kao jedan od glavnih sastojaka haritakija, posjeduje hepatoprotektivno djelovanje na staničnim modelima jetre i u jetri miševa. Tretman čebulinskom kiselinom spriječio je nastanak oštećenja, nastalih djelovanjem tert-butil hidrogena, u L-O2 hepatocitima, smanjio razine LDL-a (engl. *low density lipoproteins*) te kod miševa zaštitio jetru od ozljeda uzrokovanih tetraklormetanom.

Tablica 1. Pregled istraživanja na temu polifenolnog profila haritakija

Područje rasta	Parametri ekstrakcije	Galna kiselina i njeni derivati	Čebulinski elagitanini	Nečebulinski elagitanini	Drugi polifenolni spojevi	Referenca
Guwahati, Indija	ekstrakcija u centrifugi uz vodu kao otapalo, 2 h, 37 °C, 150 rpm, 1 g uzorka i 5 ml vode	galna kiselina (19,78 %), 4-O-galoil šikiminska kiselina (3,25 %), 5-O-galoil šikiminska kiselina (3,25 %), metil galat (5,20 %), 1,2,4,6 tri-O-galoil-β-D-glukoza (6,86 %)	čebulinska kiselina (2,17 %), čebulaginska kiselina (11,84 %), čebulininska kiselina (7,89 %)	korilagin (15,92 %)	šikiminska kiselina (0,35 %), 5-hidroksimetilfurfural (0,92 %), protokatehinska kiselina (2,84 %), elaginska kiselina (12,66 %)	Khan i sur. (2023)
Verona, Italija	ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji uz vodu kao otapalo, 1 min, sobna temperatura, 0,25 g uzorka i 50 mL vode	galna kiselina (27,96 mg g ⁻¹ uzorka), 1,6-di-O-galoil-β-D-glukoza (4,16 mg g ⁻¹ uzorka), 3,4,6-tri-O-galoil-β-D-glukoza (55,87 mg g ⁻¹ uzorka), 1,3,4,6-tetra-O-galoil-β-D-glukoza (24,25 mg g ⁻¹ uzorka), 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glukoza (13,53 mg g ⁻¹ uzorka)	čebulinska kiselina (54,03 mg g ⁻¹ uzorka), čebulaginska kiselina (29,09 mg g ⁻¹ uzorka), čebulininska kiselina (20,23 mg g ⁻¹ uzorka)	korilagin (40,31 mg g ⁻¹ uzorka), α-punikalagin (35,55 mg g ⁻¹ uzorka), β-punikalagin (41,25 mg g ⁻¹ uzorka)	elaginska kiselina (8,00 mg g ⁻¹ uzorka)	Pellati i sur. (2013)
Cairo, Egipat	ekstrakcija miješanjem uz metanol kao otapalo, 3 h, 35 °C	galna kiselina (3,68 mg g ⁻¹ uzorka), tri-O-galoil-šikiminska kiselina (3,26 mg g ⁻¹ uzorka), di-O-galoil glukoza (11,98 mg g ⁻¹ uzorka), tri-O-galoil glukoza (3,09 mg g ⁻¹ uzorka), tetra-O-galoil glukoza (6,52 mg g ⁻¹ uzorka), penta-O-galoil glukoza (3,51 mg g ⁻¹ uzorka)	čebulinska kiselina (7,99 mg g ⁻¹ uzorka), čebulaginska kiselina (24,17 mg g ⁻¹ uzorka), čebulininska kiselina (4,00 mg g ⁻¹ uzorka), čebulanin (7,17 mg g ⁻¹ uzorka), metil neočebulanin (2,18 mg g ⁻¹ uzorka), metil neočebulagat (7,14 mg g ⁻¹ uzorka), metil neočebulinat (9,01 mg g ⁻¹ uzorka)	korilagin (13,80 mg g ⁻¹ uzorka), punikalagin (11,22 mg g ⁻¹ uzorka)	elaginska kiselina (4,08 mg g ⁻¹ uzorka)	Pfundstein i sur. (2010)

Tablica 1. Pregled istraživanja na temu polifenolnog profila haritakija - nastavak

Područje rasta	Parametri ekstrakcije	Galna kiselina i njeni derivati	Čebulinski elagitanini	Nečebulinski elagitanini	Drugi polifenolni spojevi	Referenca
Kerala, Južna Indija	ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji uz etanol kao otapalo, 15 min, sobna temperatura, omjer uzorak/otapalo 1 g:10 mL	galna kiselina (13,8 mg g ⁻¹ uzorka)	čebulaginska kiselina (163,50 mg g ⁻¹ uzorka), čebulininska kiselina (59,50 mg g ⁻¹ uzorka)	arjungenin (7,15 mg g ⁻¹ uzorka),	elaginska kiselina (30,1 mg g ⁻¹ uzorka) kininska kiselina (16,9 mg g ⁻¹ uzorka), arjunolna kiselina (1,49 mg g ⁻¹ uzorka)	Singh i sur. (2016)
Lanzhou, Kina	ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji uz vodu kao otapalo, 90 min, sobna temperatura, 100 g uzorka i 600 mL vode	mono-galoil glukoza, di-galoil glukoza, metil galat, tri-galoil glukoza, tetra-galoil glukoza	čebulinska kiselina, čebulanin, čebulaginska kiselina, čebulininska kiselina	korilagin, geranin	šikiminska kiselina, elaginska kiselina	Li i sur. (2021)

Istraživanja su pokazala i neuroprotektivno djelovanje haritakija protiv Alzheimerove bolesti. Elaginska kiselina, galna kiselina i topljivi tanini iz plodova biljke dokazano inhibiraju acetilkolinesterazu (ACE) i butirilkolinesterazu (Afshari i sur., 2016).

Na modelima miševa analizirano je djelovanje haritakija na kognitivne funkcije te je uočeno da ima povoljan učinak na pamćenje i učenje (Nageswara i sur., 2013). Nadalje, Na i sur. (2004) dokazali su da je etanolni ekstrakt ploda haritakija smanjio oksidacijski stres i pokazao citoprotektivni učinak kod oštećenja uzrokovanih UVB zrakama.

Također, zabilježeno je i inhibirajuće djelovanje haritakija na skraćivanje telomera starenjem (Na i sur., 2004).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization* – WHO), 80 % svjetske populacije još uvijek koristi tradicionalne biljne lijekove za potrebe primarne zdravstvene zaštite. Trenutno se procjenjuje da postoji više od 35 000 biljnih vrsta koje se koriste u medicinske svrhe (Napagoda i sur., 2022). Zbog svojih različitih bioloških aktivnosti, uporaba haritakija raširena je u raznim tradicionalnim medicinskim sustavima. Međutim, djelotvornost ekstrakta haritakija na *in vitro* i *in vivo* biološkim sustavima još uvijek nije dovoljno istražena (Kim i sur., 2022), iako se zna da je ono posljedica prisustva različitih bioaktivnih spojeva.

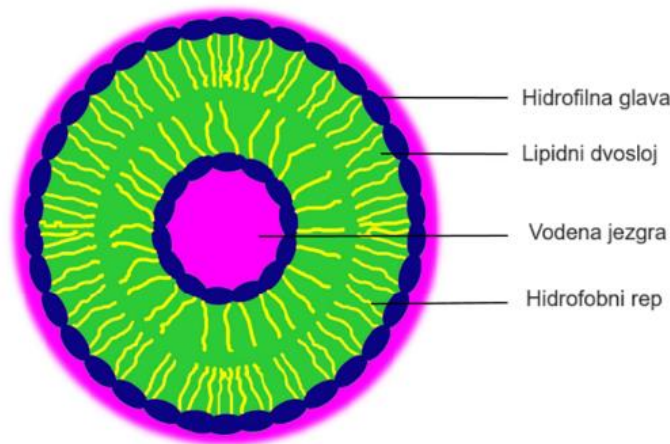
2.2. INKAPSULACIJA

Inkapsulacija je tehnika ugrađivanja krutih tvari, tekućina ili plinova u male kapsule koje kontrolirano otpuštaju svoj sadržaj tijekom duljeg razdoblja. Drugim riječima, to je proces u kojem se aktivna tvar zarobljava unutar nosača. Aktivna tvar predstavlja bioaktivni spoj ili sastojak koji se inkapsulira, a naziva se još i jezgra, ispun ili unutarnja faza. Nosač je materijal za inkapsulaciju, a naziva se još membrana, matrica ili vanjska faza (Desai i sur., 2005). Inkapsulacija pridonosi stabilnosti spojeva na način da usporava procese razgradnje (hidroliza ili oksidacija) te osigurava njihovu isporuku na ciljano mjesto u organizmu (McClements i Lesmes, 2009). Materijali koji se koriste kao nosači moraju biti jestivi i biorazgradivi, istovremeno otporni na vanjske uvjete, a ne smiju kemijski reagirati s inkapsuliranim spojem. Najčešće korišteni nosači za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji su polisaharidi (škrob i njegovi derivati, arapska guma, karaya guma, galaktomanani, karagenan, alginati, kitozan, ksantan, itd.), proteini (proteini sirutke, kazein, želatina, gluten, itd.) i lipidi (masne kiseline, masni alkoholi, voskovi, gliceridi i fosfolipidi) (Wandrey i sur., 2009). Najčešća podjela tehnika inkapsulacije je na:

- Fizikalne tehnike - sušenje raspršivanjem, ekstruzija, liofilizacija, presvlačenje u fluidiziranom sloju, inkapsulacija pomoću superkritičnih fluida
- Fizikalno-kemijske tehnike - ionsko geliranje, jednostavna ili kompleksna koacervacija, raspršivanje hlađenjem, emulgiranje, inkapsulacija isparavanjem otapala, liposomalna inkapsulacija
- Kemijske tehnike - *in situ* polimerizacija, međufazna polimerizacija, međufazna polikondenzacija, međufazno umrežavanje
- Elektrodinamičke metode - elektroispredanje, elektroraspršivanje (Abedini i sur., 2023; Eun i sur., 2020).

2.2.1. Liposomalna inkapsulacija

Liposome je 60-ih godina 20. stoljeća otkrio znanstvenik Alec D. Bangham, sa Sveučilišta Cambridge, koji je objasnio njihovu strukturu, navodeći da se sastoje od više lipidnih dvosloja (lamela) koji okružuju vodenu jezgru (Bangham i Horne, 1964). Prvobitni liposomi bili su sastavljeni od prirodnih lipida, ali do sada je već prisutno mnogo sintetskih oblika i surfaktanata. Liposomi imaju sposobnost inkapsulacije hidrofilnih i hidrofobnih spojeva. Hidrofobni spojevi smještaju se unutar lipidnog dvosloja, a hidrofilni unutar vodene jezgre. Liposomi se smatraju idealnim sustavom za isporuku lijekova zbog morfološke sličnosti sa staničnim membranama te sposobnosti učinkovite inkapsulacije malih molekula i makromolekula te biorazgradivosti (Felice i sur., 2014). Prikladnost liposoma kao sustava za isporuku ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima inkapsuliranog spoja, njegovoj veličini, površinskom naboju, organizaciji lipida, itd. (Euliss i sur., 2006). Liposomi su uglavnom sastavljeni od fosfolipida, amfifilnih molekula koje imaju hidrofilnu glavu i dva hidrofobna lanca (slika 2). Radi se o amfipatskim molekulama, diesterima fosfatne kiseline, koji su s jedne strane esterificirani derivatom glicerola ili sfingozina, a s druge strane kolinom, etanolaminom, serinom, inozitolom ili glicerolom. Liposomi se u vodenoj sredini orijentiraju u fosfolipidne dvosloje sferičnog oblika te su na ovaj način njihove hidrofilne glave u interakciji s vodenom okolinom, a hidrofobni dugi alifatski lanci u međusobnoj interakciji (Vanić, 2012).



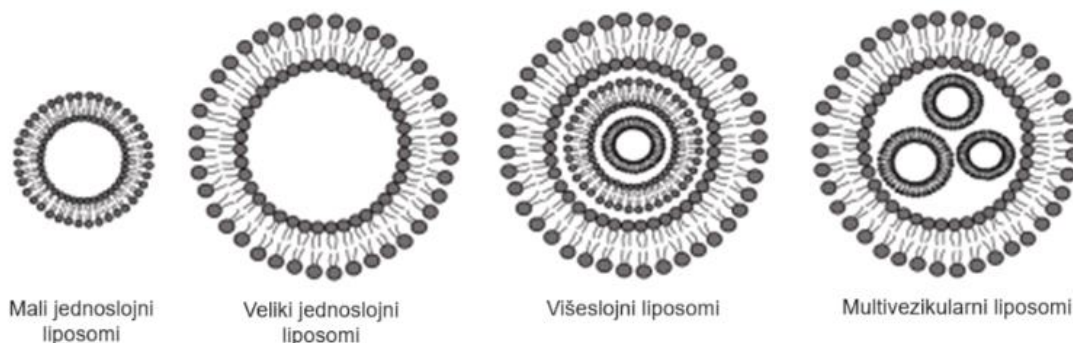
Slika 2. Struktura liposoma (prema Subramani i sur., 2020)

Ovisno o glavi fosfolipida, liposomi imaju pozitivne, negativne ili neutralne naboje (Lomabardo i sur., 2016). Svojstva liposoma, osim u površinskom naboju, mogu se očitovati u sastavu dvosloja, veličini liposoma te načinu pripreme. Sastav dvosloja može utjecati na fluidnost liposomalnih nanočestica. Za pripremu liposoma najčešće se koristi lecitin, smjesa fosfolipida s najvećim udjelom fosfatidilkolina s lancima masnih kiselina različitih duljina i zasićenosti. Nezasićene vrste fosfatidilkolina iz prirodnih izvora (fosfatidilkolin iz jaja ili soje) rezultiraju mnogo propusnijim i manje stabilnim dvoslojem, dok zasićeni fosfolipidi s dugim acilnim lancima čine krutu, prilično nepropusnu, ali stabilniju dvoslojnu strukturu (Akbarzadeh i sur., 2013). Još jedan važan parametar koji može utjecati na fluidnost lipida unutar dvostrukog sloja je temperatura prijelaza fosfolipida koja se odnosi na temperaturu na kojoj fosfolipidi prelaze iz gel u tekuću fazu (Zamani i sur., 2018).

Prema strukturi, liposomi se mogu klasificirati u četiri kategorije (slika 3):

- 1) Jednoslojni liposomi sadrže samo jedan fosfolipidni dvosloj. S obzirom na veličinu dijele se na:
 - a) male jednoslojne liposome, promjera 20 – 100 nm
 - b) srednje-velike jednoslojne liposome, promjera većeg od 100 nm
 - c) velike jednoslojne liposome, promjera 100 – 1000 nm
 - d) gigantski jednoslojne, promjera većeg od 1000 nm
- 2) Oligoslojni liposomi sastoje se od nekoliko koncentrično složenih fosfolipidnih dvosloja između kojih su smješteni vodeni prostori.
- 3) Višeslojni liposomi sastoje se od mnoštva koncentričnih fosfolipidnih dvosloja, pri čemu volumen vodene faze može varirati: najveći je unutar središnje ovojnice, jednak ili različit između pojedinih ovojnica.

- 4) Multivezikularni liposomi sastoje se od manjih vezikula unutar velikog liposoma pri čemu mogu nastati velike sferične strukture nalik na pjenu. Njihova veličina iznosi 1000 – 2000 nm (Vanić, 2012).



Slika 3. Klasifikacija liposoma na temelju veličine (*prema* Guimaraes i sur., 2021)

Postoje razne metode pripreme liposoma koje utječu na specifična svojstva liposoma, kao što su veličina, broj dvosloja i inkapsulacijska učinkovitost (Pattni i sur., 2015). Među konvencionalnim metodama, ističu se metode hidratacije tankog filma, obrnute faze evaporacije, ubrizgavanje otapala i metoda uklanjanja detergenata (Meure i sur., 2008). Ove metode uključuju sljedeće faze: otapanje lipida u organskim otapalima, uklanjanje organskog otapala, pročišćavanje i izolacija liposoma te analiza finalnih liposoma (Akzbarzadeh i sur., 2013). Neke od novih metoda pripreme liposoma temelje se na modifikaciji i poboljšanju konvencionalnih metoda. Među novim metodama javljaju se „*cross-flow*“ ubrizgavanje ili metoda po Wagneru (Wagner i sur., 2002) i tehnologija konstrukcije membrana (Charcosset i sur., 2005). Nakon proizvodnje, a prije primjene, liposomi se moraju temeljito karakterizirati radi procjene njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava, kako bi se osigurala njihova *in vitro* i *in vivo* učinkovitost (Cagdas i sur., 2014). Najistraživanija svojstva koja se koriste za karakterizaciju liposoma su veličina, raspodjela veličine (prikazana pomoću indeksa polidisperzije), površinski naboj, oblik, lamelarnost, učinkovitost inkapsulacije te otpuštanje aktivnog spoja *in vitro* (Pattni i sur., 2015). Liposomi su pokazali obećavajuće rezultate kao sustavi isporuke za brojne vrste lijekova. Inkapsulacija lijekova unutar liposoma poboljšava njihov terapijski učinak zbog promjena u farmakokinetici i farmakodinamici (Bulbake i sur., 2017). Farmakokinetika liposoma temelji se na njihovoj distribuciji kroz tjelesne tekućine i tkiva te njihov metabolizam. Prednosti liposomalnih inkapsulata su bolja topljivost inkapsuliranog spoja, produženo trajanje poluživota inkapsuliranog spoja, selektivno usmjerenje na ciljano mjesto djelovanja, poboljšani terapijski indeks te otpornost na kemoterapeutike (Bozzuto i Molinari, 2015).

2.2.2. Metabolizam polifenola i utjecaj inkapsulacije na njihovu bioraspoloživost

Za uspješan razvoj inkapsulacijskih sustava za ciljanu isporuku bioaktivnih spojeva, nužno je razumjeti fiziološke i fizikalno-kemijske uvjete u ljudskom probavnom sustavu, kao i metabolizam bioaktivnih spojeva. Kako bi konzumirani bioaktivni spojevi djelovali unutar organizma, u specifičnim tkivima ili organima, moraju biti bioraspoloživi. To znači da moraju biti učinkovito apsorbirani iz crijeva u sistemsku cirkulaciju te isporučeni na odgovarajuće mjesto u tijelu (Chen i sur., 2018).

Polifenoli se nakon unosa metaboliziraju te njihova koncentracija u krvi može biti znatno niža nego ona unesena hranom. Vrlo mali broj polifenola unesenih hranom izlučuje se u nepromijenjenom obliku te na biološko djelovanje polifenola u organizmu ne utječu samo ishodišne molekule, već i njihovi metaboliti (Gessner i sur., 2017). Prvi korak u metabolizmu polifenolnih spojeva predstavlja žvakanje u usnoj šupljini gdje dolazi do miješanja hrane sa slinom koja se pretežno sastoji od vode (99,5 %), zatim 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. Nakon žvakanja u usnoj šupljini, bolus hrane, nastao u ustima, peristaltikom dolazi do želuca. Hrana se zadržava u želucu 0,3 – 2 sata, a tijekom tog razdoblja djelovanjem kiselina i miješanjem dolazi do razgradnje prožvakane 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. Nakon želuca, polifenoli dopijevaju u alkalnu sredinu tankog crijeva. Prvi dio tankog crijeva dvanaesnik i jejunum su glavna mjesta apsorpcije i transformacije polifenolnih spojeva. Promjena u pH vrijednosti doprinosi destabilizaciji polifenola. Kako bi prošli staničnu membranu enterocita, glikolizirani polifenoli, različitim mehanizmima podliježu reakcijama hidrolize. 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 (Velderrain-Rodríguez i sur., 2014). U debelo crijevo dopijeva velik broj unesenih polifenola (80 – 90 %), uključujući one koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu i one koji su se apsorbirali i metabolizirali. 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 (Liu i sur., 2022). U istraživanju Seguin i sur. (2013) dokazano je da polifenolni spoj fizetin pokazuje

veću bioraspoloživost u liposomalnom inkapsulatu u odnosu na slobodni oblik. Povećana bioraspoloživost rezultat je akumulacije liposomalnog inkapsulata fizetina u jetri miševa te njegovog usporenog otpuštanja u krvotok. Također, Mignet i sur. (2013) proveli su uspješnu liposomalnu inkapsulaciju raznih polifenolnih spojeva kako bi poboljšali njihovu bioraspoloživost u organizmu. Slaba topljivost u vodi, slaba apsorpcija i brzi metabolizam umanjuju bioraspoloživost polifenola, stoga im inkapsulacijski sustavi povećavaju stabilnost unutar probavnog sustava i terapijski učinak.

2.3 ČOKOLADA

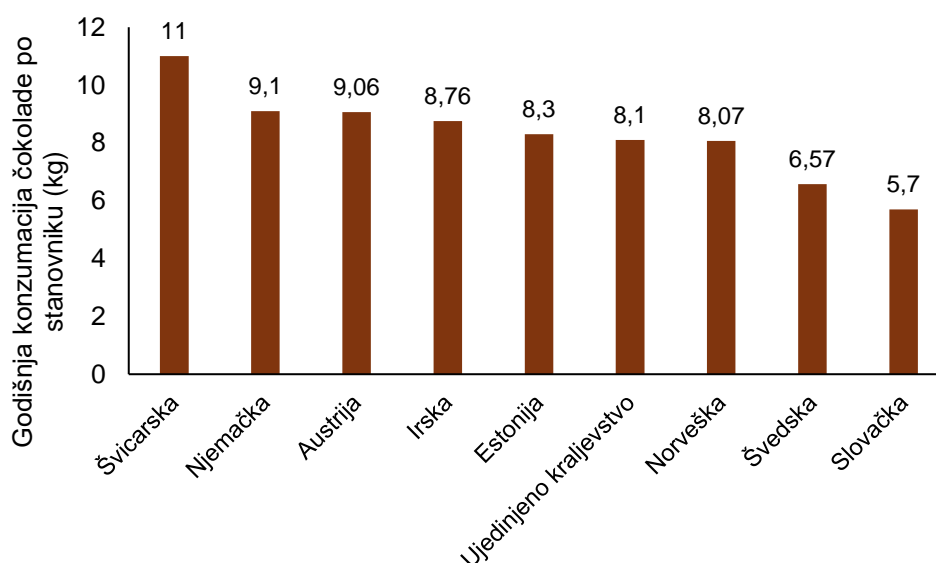
2.3.1. Proizvodnja i konzumacija čokolade

Najvažnija sirovina za izradu čokolade, ali i ostalih kakaovih proizvoda su kakaova zrna. Kakaova zrna nalaze se unutar ploda biljke kakaovac, botaničkog naziva *Theobroma cacao* L. Kvaliteta čokolade ovisi o podrijetlu i kvaliteti kakaovih zrna koja moraju biti proizvedena od potpuno zrelih plodova te na pravilan način fermentirana i osušena. Prženje kakaovih zrna, ovisno o karakteristikama zrna, provodi se u temperaturnom rasponu od 70 do 140 °C kroz 5 do 70 minuta. Tijekom prženja dolazi do smanjenja udjela vode na približno 2 %, smanjenja kiselosti i čvrstoće zrna te formiranja arome. Odmah nakon termičke obrade pržena kakaova zrna treba ohladiti na temperaturu 40 – 50 °C radi zaustavljanja procesa termičke razgradnje kakaovih zrna. Nakon prženja, slijedi drobljenje i odvajanje ljuske i kakaovog loma iz prženih polomljenih zrna. Kakaov lom predstavljaju jezgre kakaovih zrna očišćene od ljuske i klice. Iz mase zdrobljenih zrna može se izdvojiti od 80 do 86 % kakaovog loma, koji se potom prerađuje u kakaovu masu iz koje se daljnjim postupcima mogu proizvoditi kakaov prah i kakaov maslac. Izrada čokoladne mase, sastoji se od pripreme zamjesa (kakaova masa, kakaov maslac, šećer u prahu i po potrebi mlijeko u prahu), valcanja i končiranja. Valcanje je postupak usitnjavanja krutih čestica bezmasne suhe tvari čokoladne mase čime se omogućava lakši i učinkovitiji daljnji postupak izrade čokoladne mase i čokoladnih proizvoda te postizanje glatke teksture tih proizvoda, tj. osjeta potpune topljivosti i punoće okusa. Končiranje je završni postupak u izradi čokoladne mase, tijekom kojeg dolazi do razvoja željene čokoladne arome i pretvorbe praškasto-grudičastog valcanog proizvoda u tekuću suspenziju. Slijedi temperiranje čokoladne mase što predstavlja postupak preoblikovanja centara krute masti u taljevini u željeni stabilan kristalni oblik i to prije nego dođe do potpunog skrućivanja čokoladne mase u konačni oblik proizvoda. Ako temperiranje nije dobro provedeno na površini čokolade može kristalizirati

kakaov maslac i pojavljuju se bijele mrlje ili tanki sivo-bijeli sloj. Zatim slijedi oblikovanje mase u kalupima te pakiranje (Goldoni, 2004).

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. 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 (Afoakwa, 2016).

Prema podacima RationalStat (2022) globalno tržište čokolade bilježi snažan godišnji rast od 8,2 %, a globalna potrošnja čokolade doseže 8,13 milijuna tona. Godišnja potrošnja čokolade u Europi iznosi 5 kilograma po stanovniku, a u svijetu 0,9 kilograma po stanovniku. Najviše čokolade po stanovniku godišnje (11 kg) konzumira se u Švicarskoj, potom u Njemačkoj (9,1 kg) te SAD-u (8,9 kg). Na slici 4 prikazano je deset europskih država koje konzumiraju najviše čokolade (RationalStat, 2022). U Hrvatskoj se konzumira oko 2,2 kg čokolade po stanovniku godišnje (GAIN, 2016).



Slika 4. Godišnja konzumacija čokolade po stanovniku u Europi (prema RationalStat, 2022)

Orašasti plodovi dugi niz godina ostaju najpopularniji dodatak za čokoladne konditorske proizvode, a četiri najpopularnija dodatka u 2018. godini, a i danas, su: lješnjak, badem, karamela i kikiriki. Potrošači traže i nove okuse čokolada jer žele proširili i testirati vlastite preferencije. Između 2018. i 2022. godine lansirano je 100 novih okusa u svijetu, a pet glavnih

trendova u novim okusima su brownie, datulja, jogurt, saće i sol (Innova market Insights, 2023). Uvođenje koncepta održivosti u proizvodnju čokolade, poticanje zaštite i obnavljanje okoliša i osiguravanje adekvatnih uvjeta rada za poljoprivrednike i radnike na farmama kakaovih zrna također postaju sve prisutniji trendovi na tržištu. Na tržištu je sve veći broj čokoladnih proizvoda s certifikatima, kao što su Fair Trade Original, Rainforest Alliance, USDA Organic, itd. Čak 68 % potrošača diljem svijeta zainteresirano je za proizvode koji potječu iz održivog poljoprivrednog uzgoja (Tastetomorrow, 2023).

Biljne namirnice također dobivaju sve više na značaju u proizvodnji čokoladnih proizvoda pošto potrošači sve više traže veganske čokolade te se veganske tvrdnje na takvim proizvodima mogu sve češće naći (Innova market Insights, 2023).

2.3.2. Čokolada kao funkcionalna hrana

Čokolada je omiljeni konditorski proizvod svih generacija potrošača, a ljudi konzumiraju kakaova zrna od davnina te su ih autohtoni narodi u srednjoj Americi prvobitno koristili u medicinske svrhe kao lijek. Dokazi o zdravstvenim dobrobitima kakaovih zrna dolaze od indijskog naroda Kuna u Panami koji i danas imaju nižu stopu hipertenzije i dijabetesa, raka i moždanih udara. Dolaskom čokolade u Europu, njena uporaba se brzo proširila te je dokumentirano gotovo 150 načina njene primjene u medicinske svrhe, uključujući poboljšanje probave, stimulaciju živčanog sustava, antidepresivno djelovanje i poboljšanje kognitivnih performansi (Katz i sur., 2011; Jalil i sur., 2008).

Zdravstvene dobrobiti kakaovih i čokoladnih proizvoda uglavnom se pripisuju antioksidacijskim svojstvima polifenolnih spojeva čiji se udio u kakaovim zrnima kreće u rasponu 12 – 18 %, pri čemu dominiraju flavan-3-oli, antocijani i proantocijanidini (Paranjape i sur., 2021). Smatra se da upravo oni pridonose kardiometaboličkim zdravstvenim dobrobitima modulacijom krvnog tlaka i profila lipida (Tan i sur., 2021).

Prema Uredbi Europske 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 benefite konzumacije čokolade u smanjenju rizika od kardiometaboličkih oboljenja, uključujući koronarne bolesti srca, infarkt miokarda, moždani udar i dijabetes (Yuan i sur., 2017; Larsson i sur., 2016).

Udio polifenolnih spojeva veći je kod čokoladnih proizvoda s većim udjelom kakaovih dijelova te je tako u istraživanju Medeiros i sur. (2015) određeno da čokolada sa 67 % kakaovih dijelova sadrži 106,81 μmol ekvivalenta katehina g^{-1} uzorka, a mliječna čokolada s 43 % kakaovih dijelova svega 28,44 μmol ekvivalenta katehina g^{-1} uzorka.

Funkcionalna hrana definira se kao hrana koja pruža dodatnu zdravstvenu dobrobit iznad osnovne prehrambene vrijednosti hrane (Khan i sur., 2013). Potrošači su danas svjesni utjecaja prehrane na zdravlje te traže nove proizvode s dobrim okusom, a koji istovremeno pružaju određene zdravstvene benefite. Takvi zahtjevi predstavljaju izazov konditorskoj industriji koja ih nastoji zadovoljiti reformulacijama proizvoda smanjivanjem udjela šećera i masti te obogaćivanjem različitim funkcionalnim sastojcima. Čokolada je prikladan matriks zbog zanimljivih senzorskih svojstava i „zaštitnog“ učinka koji ima na bioaktivne spojeve tijekom probave. Jedna od prednosti korištenja čokolade kao matriksa za isporuku bioaktivnih spojeva jest mogućnost prekrivanja neugodnih okusa te se stoga bioaktivni sastojci, poput omega-3 masnih kiselina, probiotika, vitamina, mineralnih tvari i polifenolnih spojeva, mogu uspješno inkorporirati u čokoladne formulacije. Također, bioaktivni spojevi prisutni u tim čokoladnim proizvodima mogu djelovati kao konzervansi za produženje roka trajanja proizvoda (Faccinnetto-Beltran i sur., 2021). Primjeri istraživanja funkcionalnih čokolada prikazani su u tablici 2, a neke od čokolada obogaćenih različitim funkcionalnim sastojcima i dostupnih na tržištu nalaze se na slici 5.

Tablica 2. Primjeri znanstvenih istraživanja funkcionalnih čokolada

Vrsta čokolade i udjel kakaovih dijelova	Vrsta i udjel dodanog funkcionalnog sastojka	Zaključak	Referenca
Čokolada s 70 % kakaovih dijelova	Prah lišća Sakura zelenog čaja (2 %)	Dodatak praha lišća zelenog čaja uzrokovao je povećanje udjela ukupnih polifenola čokoladi.	Martini i sur. (2018)
Mliječna čokolada (30 % kakaovih dijelova), čokolada (78 % kakaovih dijelova)	Koncentrirani vodeni ekstrakt (1 i 3 %) lista maline i liofilizirani ekstrakt lista maline (1 %)	Dodatak ekstrakta u udjelu od 3 % povećao je koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet čokolade.	Belščak Cvitanović i sur. (2013)
Bijela čokolada	Vitamin D (5 µg 10 g ⁻¹ čokolade) u slobodnom obliku i u liposomalnom obliku	Dodatak obje formulacije vitamina D nije imao značajan utjecaj na indeks boje, reološka svojstva, DSC parametre i senzorske karakteristike čokolade. Liposomalni inkapsulat vitamina D pokazao je sporije otpuštanje <i>in vitro</i> što potvrđuje bolju stabilnost u odnosu na slobodni oblik.	Didar (2021)
Čokolada s 45 % kakaovih dijelova	Ekstrakti bobica i cvjetova bazge i aronije (5 %)	Dodatak ekstrakta omogućio je formulaciju čokolada izraženog antioksidacijskog kapaciteta i visokog udjela polifenolnih spojeva.	Polinski i sur. (2021)
Čokolada s 60 i 65 % kakaovih dijelova	Mljeveni morski trn (20 %) i mljeveni crni dud (15 %)	Dodatak crnog duda povećao je antioksidacijski kapacitet čokolade s 65 % kakaovih dijelova, a morski trn ukupni sadržaj polifenola u čokoladi s 60 % kakaovih dijelova.	Godočikova i sur. (2017)
Bijela čokolada	Ekstrakt zelenog čaja inkapsuliran maltodektrinom i sušen raspršivanjem (100 mg kg ⁻¹)	Dodatak ekstrakta povećao je ukupni sadržaj polifenola s 0,41 (mgGAE kg ⁻¹) u bijeloj čokoladi na 2,73.	Lončarević i sur. (2019)
Mliječna čokolada (16 % kakaovih dijelova)	Liofilizirani ekstrakt kelja (1 %) i grožđa (2 %)	Dodatak ekstrakata povećao je udio vlakna i mineralnih tvari u čokoladi.	Carvalho i sur. (2018)
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.	Poliński i sur. (2022)
Čokolada s 70 % kakaovih dijelova	Smjesa ekstrakata kadulje i Španjolske kadulje (300, 400 i 500 mg) i ekstrakt acerole (256 mg)	Čokolada formulirana dodatkom 400 mg smjese kadulje i španjolske kadulje te 256 mg ekstrakta acerole imala je najbolje rezultate za tvrdoću, svojstva taljenja i senzoričku, a reološka svojstva i raspodjela veličine čestica bila su skoro identična za sva 3 uzorka čokolade.	Zarić i sur. (2024)

Tablica 2. Primjeri znanstvenih istraživanja funkcionalnih čokolada - nastavak

Vrsta čokolade i udjel kakaovih dijelova	Vrsta i udjel dodanog funkcionalnog sastojka	Zaključak	Referenca
Bijela čokolada	Inkapsulat ekstrakta šipka i bakterije <i>Lactobacillus acidophilus</i> (1 %)	Dodatak inkapsulata povećao je antioksidacijsku aktivnost, udio ukupnih polifenola i tvrdoću čokolade. Povećana je biodostupnost antocijana i životni vijek <i>L. acidophilus</i> . Dodatak inkapsulata nije imao značajan utjecaj na senzorske karakteristike čokolade.	Didar (2024)
Čokolada s 6 % kakaovih dijelova	Mikroinkapsulat ulja chia sjemenki (5, 10 i 15 %)	Dodatak mikroinkapsulata ulja chia sjemenki u bilo kojem udjelu nije značajno utjecao na senzorske karakteristike formulirane čokolade, niti na tvrdoću i svojstva taljenja. Na temelju ovog istraživanja dokazano je da je čokolada dobar matriks za inkorporaciju mikroinkapsulata.	Razavizadeh i sur. (2021)
Čokolada s 51 % kakaovih dijelova	Prah pulpe baobaba (3, 6 i 9 %)	Proporcionalno s količinom dodanog praha raste i antioksidacijski kapacitet čokolade te udjeli vitamina C, kalcija, kalija, fosfora, klora i sumpora. Senzorskom procjenom utvrđeno je da čokolada s dodatkom praha pulpe baobaba u udjelu od 3 % ima najbolja senzorska svojstva, a čokolada s dodatkom od 9 %, najlošija. Nije primjećen utjecaj dodatka praha na profil masnih kiselina, proteine, masti i tvrdoću čokolade.	Monteiro i sur. (2023)
Čokolada s 10,4 % kakaovih dijelova	Proteini sirutke (6 %)	Čokolada s dodatkom proteina sirutke sadrži veći udio ukupnih polifenola, veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi s mliječnom čokoladom bez dodatka. Dodatak proteina sirutke nije značajno utjecao na tvrdoću, svojstva taljenja i senzorske karakteristike čokolade.	Rakin i sur. (2023)
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)



Čokolada s 60% kakaovih dijelova s dodatkom ginko bilobe, aminokiselina, omega 3 kiselina i ekstrakta zelenog čaja (The Functional Chocolate Company, SAD)



Čokolada s 60 % kakaovih dijelova s dodatkom badema, kave, ashwagandhe i ginsenga (Awsum, Indija)



Čokolada s dodatkom 5- hidroksitriptofana i melatonina (Fx Chocolate, SAD)



Čokolada s ekstraktom lavlje grive i astragalusa (Joya, SAD)



Čokolada s dodatkom suhih smokvi i slatkog vina (Nadalina, Hrvatska)



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



Čokolada s dodatkom kofeina, vitamina B12 i vitamina D (FourX Better Chocolate, Kanada)



Čokolada s dodatkom pepermint, matcha praha i kanabidiola (Soaring Free, Južna Afrika)



Bijela čokolada s dodatkom matcha praha, ashwagandha ekstrakta i liofiliziranih jagoda (Mac's Topicals, SAD)



Čokolada s 33 % kakao dijelova s dodatkom meda i liofiliziranih višanja (Vrsna Chocolates, Hrvatska)



Čokolada s dodatkom lavande (Nadalina, Hrvatska)



Čokolada s dodatkom kolagena (Max Sport, Slovačka)

Slika 5. Primjeri komercijalnih čokolada obogaćenih funkcionalnim sastojcima

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZORCI

U ovome istraživanju korišten je ekstrakt ploda biljke haritaki (*Terminalia chebula* Retz.) proizvođača Synastol TC (SAD). Ekstrakt biljke je u praškastom obliku, žuto-smeđe boje. Prema specifikaciji proizvođača ekstrakt haritakija obuhvaća ≥ 50 % topljivih tanina niske molekulske mase i ≥ 90 % ekstraktibilne suhe tvari. Olovo, arsen, živa i kadmij prisutni su u udjelu ≤ 1 ppm.

3.2. KEMIKALIJE

- 2-tiobarbiturna kiselina, Sigma-Aldrich, Njemačka
- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Acetonitril, Fischer Scientific, SAD
- Amonijev karbonat, Lach-ner d.o.o., Češka
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Elaginska kiselina (≥ 95 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Etanol, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika d.d., Hrvatska
- Galna kiselina (> 97 %), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Kalijev dihidrogen fosfat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Kalijev klorid, Kemika d.d., Hrvatska
- Kloroform, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Klorovodična kiselina, Kemika d.d., Hrvatska
- Magnezijev klorid heksahidrat, Lach-ner d.o.o., Češka
- Metanol, J.T. Baker, SAD
- 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
- 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

- Trikloroctena kiselina, Fisher Scientific, Engleska
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) (> 98 %), SigmaAldrich, Njemačka
- Žuč goveda, Sigma-Aldrich, Njemačka

3.3. SIROVINE ZA PRIPREMU ČOKOLADE

- Kakaov maslac, Barry Callebaut, Belgija
- Kakao masa, Barry Callebaut, Belgija
- Suncokretov lecitin, Nutrimedica d.o.o., Hrvatska
- Šećer u prahu, Franck d.d., Hrvatska

3.4. LABORATORIJSKA OPREMA

- Analitička vaga, New Classic MF, Mettler Toledo AG, Švicarska
- Analitički sakupljač frakcija Agilent 1260 Infinity II, Agilent Technologies, SAD
- Centrifuga SL8/8R, Thermo Scientific
- DSC uređaj 214 Polyma Differential Scanning Calorimeter, NETZCH, Njemačka
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg Labortechnik GmbH, Njemačka
- Malvern Mastersizer MS2000, Malvern, UK
- Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern, UK
- Melanžer, Twin Stone, SAD
- Sušionik, Instrumentaria, Hrvatska
- Tehnička vaga, A&D Instruments, UK
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies, SAD
- TripleQuad 6460 LC/MS sustav, Agilent Technologies, SAD
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, Elma, Njemačka
- Uređaj za ispitivanje teksture TA.HD.plus, Stable Micro Systems, UK
- 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

3.5. METODE

3.5.1. Karakterizacija sastava ekstrakta haritakija

3.5.1.1. Određivanje udjela suhe tvari

Udio suhe tvari uzorka određen je prema AOAC 930.15 (1990) metodi sušenjem uzorka do konstantne mase. Uzorci mase 0,5 g ($\pm 0,1$ g) izvagani su na analitičkoj vagi u prethodno osušene i ohlađene aluminijske lončiče s poklopcem. Uzorak u otvorenim posudicama sušio se u laboratorijskom sušioniku pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja, posudice su se zatvorile i položile u eksikator. Nakon hlađenja u eksikatoru, posudice s uzorkom, sobne temperature, vagale su se na analitičkoj vagi. Udio suhe tvari, izračunao se prema razlici masa posudica s uzorkom, prije i nakon sušenja, prema formuli [1]:

$$\% \text{ suhe tvari} = \frac{m_2 - m_1}{m (\text{uzorak})} \times 100 \quad [1]$$

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.5.1.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Odvagano je 0,1 g uzorka ekstrakta i otopljeno u 5 mL 70 %-tnog metanola. Pripremljena vodeno-metanolna otopina korištena je za analizu udjela ukupnih polifenola prema metodi opisanoj u radu Singleton i Rossi (1965). U reakcijsku smjesu dodalo se 3,95 mL destilirane vode, 50 μ L pripremljene otopine ekstrakta, 250 μ L Folin-Ciocalteu reagensa, koji je razrijeđen s vodom u omjeru 1:2, i 750 μ L 20 %-tne otopine natrijevog karbonata. Nakon 30 minuta izmjerena je apsorbancija reakcijske smjese pri valnoj duljini od 765 nm. Baždarna krivulja izrađena je korištenjem otopine galne kiseline različite koncentracije (25 – 250 μ g mL⁻¹) te su rezultati prikazani kao ekvivalenti galne kiseline (EGK).

3.5.1.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet uzorka određen je metodom prema Brand-Williams i sur. (1995). Reakcijska smjesa sastojala se od 100 μ L uzorka i 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH u metanolu. Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbancija na 515 nm. Baždarna krivulja izrađena je korištenjem otopine Trolox-a u različitim koncentracijama (25 – 250 μ g mL⁻¹).

3.5.1.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Antioksidacijski kapacitet uzorka određen je i metodom po Re i sur. (1999). Za provođenje ove reakcije pripremljena je 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. Takva otopina razrijeđena je etanolom do konačne koncentracije ABTS radikala od 1 %. U reakcijsku smjesu dodano je 40 μ L uzorka i 4 mL otopine ABTS radikala.

Nakon 6 minuta, izmjerena je apsorbanca na 734 nm. Baždarna krivulja izrađena je korištenjem otopine Trolox-a u različitim koncentracijama (25 – 250 µg mL⁻¹).

3.5.1.5. Određivanje udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 pomoću Zorbax Extend C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm i.d.) kolone (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 3. Protok je iznosio 1 mL min⁻¹, volumen injektiranja 5 µL, a temperatura kolone bila je 25 °C. Analiti su detektirani pomoću PDA detektora pri valnoj duljini od 260 nm. Svi uzorci su filtrirani kroz 0,45 µm membranski filter (Nylon Membranes, SAD) prije analize, a analize svih uzoraka provedene su u duplikatu. Na dobivenim kromatogramima ekstrakata bilo je vidljivo dobro razdvajanje pikova, no, zbog nedostatka odgovarajućih standarda pojedini pikovi se inicijalno nisu mogli identificirati. Stoga se uzorak podvrgnuo frakcioniranju pomoću analitičkog sakupljača frakcija, a sakupljene frakcije analizirane su sinergijom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS) prema metodi opisanoj u radu Pfundstein i sur. (2010).

Tablica 3. Režim elucije za primjenjenu HPLC metodu

Vrijeme (min)	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

3.5.2. Liposomalna inkapsulacija polifenolnih spojeva haritakija

Liposomalna inkapsulacija polifenolnih spojeva haritakija provedena je prema metodi Perrett i sur. (1991). Za provedbu inkapsulacije korišten je fosfolipid Phospholipon 90 G (1 g) otopljen u istoj masi etanola u tikvici, uz miješanje (2 minute) i grijanje na 60 °C. U istu tikvicu je, nakon hlađenja, dodan ekstrakt haritakija. Pripremljena su 2 liposomalna inkapsulata – s 50 mg (uzorak L_50) i 100 mg (uzorak L_100) ekstrakta koji su nakon otapanja u 70 %-tnom metanolu prebačeni u tikvicu s otopljenim fosfolipidom. U dobivenu otopinu, uz konstantno miješanje, dodano je 50 mL destilirane vode koristeći peristaltičku pumpu uz protok 15 mL h⁻¹. Na opisani način, pripremljeni su i prazni liposomi, bez dodatka ekstrakta.

3.5.2.1. *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 je s 3 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) i pojedinačnih polifenolnih spojeva (poglavlje 2.1.5.), kao omjer njihove masene koncentracije određene u izdvojenoj vodeno-metanolnoj fazi i zbroja udjela iste koncentracije i udjela određenog u prvom izdvojenom supernatantu.

3.5.2.2. *Određivanje fizikalnih parametara liposoma*

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

3.5.2.3. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta TBARS metodom*

Peroksidacija pripremljenih liposoma, praznih i s inkapsuliranim ekstraktom, izmjerena je spektrofotometrijski, određivanjem koncentracije malondialdehida tiobarbiturnim testom (TBARS – engl. *tiobarbituric acid reactive substances*). Prazni liposomi i liposomi s inkapsuliranim ekstraktom bili su podvrgnuti djelovanju pulsirajućeg UV zračenja s energijom zračenja po impulsu $1,27 \text{ J cm}^{-2}$. Alikvot od 500 μL izuzet je nakon 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 i 200 pulseva UV zračenja. Dobiveni alikvoti korišteni su za pripremu reakcijske smjese. U staklenim epruvetama s navojnim čepom pripremljena je reakcijska smjesa od 200 μL alikvota uzorka liposoma, 3 mL prethodno pripremljene 20 %-tne trikloroctene kiseline i 1 mL *stock* otopine koja se sastojala od jednakog volumena 2 %-tne tiobarbiturne kiseline i 20 %-tne perklorne kiseline. Reakcijska smjesa pomješana je na vortex-u, zatim stavljena u vodenu kupelj na 100 °C kroz 25 minuta. Reakcija je zaustavljena vađenjem epruveta iz kupelji i stavljanjem u hladnjak na 5 minuta. Ohlađene epruvete s reakcijskom smjesom stavljene su u centrifugu (9500 rpm, 10 minuta), kako bi se uklonio nastali precipitat, nakon čega se apsorbancija supernatanta mjerila na 532 nm.

3.5.2.4. *Praćenje kinetike otpuštanja polifenola iz liposoma u uvjetima simulirane probave*

Praćenje kinetike otpuštanja polifenola haritakija iz liposomalnih sustava provedeno je koristeći otopine simulirane želučane (SGF – engl. *simulated gastric fluid*) i intestinalne (SIF – engl.

simulated intestinal fluid) faze, pripremljene prema metodi Minekus i sur. (2014). Uz anorganske soli (kalijev klorid, kalijev dihidrogen fosfat, natrijev hidrogen karbonat, natrijev klorid, magnezijev klorid heksahidrat i amonijev karbonat), otopina SGF-a sadržavala je pepsin ($52,67 \text{ mg mL}^{-1}$) i pH je bio podešen na 3 uz dodatak klorovodične kiseline. Otopina SIF-a je, uz anorganske soli (kalijev klorid, kalijev dihidrogen fosfat, natrijev hidrogen karbonat, natrijev klorid, magnezijev klorid heksahidrat i amonijev karbonat) sadržavala pankreatin (1 mg mL^{-1}) i žučne soli (2 mg mL^{-1}) i pH je bio podešen na 7 uz dodatak natrijeve lužine. Liposomalni inkapsulat je prebačen u 30 mL otopine SGF-a, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$. U odgovarajućim vremenskim intervalima iz otopine je uzorkovano $200 \text{ }\mu\text{L}$ alikvota do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 sata. Zatim su inkapsulati prebačeni u 30 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) koji je izražen u mg ekvivalenata galne kiseline po gramu inkapsulata.

3.5.3. Formulacija čokolada

Proizvodnja čokolada provedena je miješanjem svih sastojaka u melanžeru kroz 1 sat. Kakaova masa i kakaov maslac su prije stavljanja u zamjes za čokoladnu masu zagrijani na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ te u tekućem obliku stavljeni u melanžer. Nakon miješanja u melanžeru, dobivena čokoladna masa ručno je temperirana pri čemu se najprije zagrijala na $45 - 50 \text{ }^\circ\text{C}$, potom se hladila do $28 \text{ }^\circ\text{C}$ i ponovno zagrijala na $32 \text{ }^\circ\text{C}$, uz konstantno miješanje, a na kraju lijevala u kalupe. Pripremljene su 2 formulacije čokolada. Kontrolni uzorak (uzorak Č_K) pripremljen je bez dodatka inkapsulata, odnosno sadržavao je kakaovu masu (75 %), kakaov maslac (9 %), šećer u prahu (15 %) i suncokretov lecitin (1 %). Druga formulacija (uzorak Č_L) uključila je dodatak liposomalnog inkapsulata ekstrakta haritakija u udjelu od 10 % na masu čokolade, koji je dodan zajedno s ostalim sastojcima čokolade u melanžer.

3.5.3.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolade

Kako bi se okarakterizirao bioaktivni sastav čokolada, istima je određen udjel ukupnih polifenola (Singleton i Rossi, 1965) i antioksidacijski kapacitet DPPH (Brand Williams i sur, 1995) i ABTS (Re i sur., 1999) metodama. Uzorci pripremljenih čokolada (3 g) rastalili su se u vodenoj kupelji, nakon čega je slijedio dodatak 10 mL vode, zagrijane do vrenja, te ekstrakcija na magnetskoj miješalici u trajanju od 15 minuta i potom u ultrazvučnoj kupelji ($50 \text{ }^\circ\text{C}$), također kroz 15 minuta. Nakon toga, uzorci su ohlađeni te je slijedio dodatak 10 mL metanola te ponovno ekstrakcija na magnetskoj miješalici kroz 15 minuta i potom u ultrazvučnoj kupelji ($50 \text{ }^\circ\text{C}$) kroz 15 minuta. Uzorci su potom centrifugirani (9500 rpm, 20 minuta), a prikupljeni supernatanti koristili su se za analizu bioaktivnog sastava.

3.5.3.2. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola iz čokolada u uvjetima simulirane probave

Praćenje kinetike otpuštanja polifenola iz čokolada u uvjetima simulirane probave provedeno je na isti način kao i slučaju liposomalnog inkapsulata, odnosno prema metodi opisanoj u poglavlju 3.5.2.4.

3.5.3.3. Određivanje reoloških svojstava čokolade

Reološka svojstva čokolada određena su prema metodi IOCCC (2000), koristeći Casson-ov model. Mjerenje je provedeno na temperaturi od 40 °C, a prije početka analize na čokolade je primjenjena 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).

3.5.3.4. Određivanje raspodjele veličine čestica

Raspodjela veličine čestica formuliranih čokolada određena je metodom laserske difrakcije pomoću instrumenta Malvern Mastersizer s odabranom jedinicom za tekuće uzorke Hydro 2000S. Uređaj je spojen na računalo i kontroliran preko programa Mastersizer 2000 5.60. Čokolade (10 g) su prije mjerenja homogenizirane u suncokretovom ulju (300 mL). Prije pokretanja postupka mjerenja, provela se kalibracija uređaja nakon čega se postupno dodao uzorak prateći stupanj zasićenja na ekranu računala. Parametri raspodjele veličine čestica koji su analizirani kod ovih uzoraka bili su d(0,9), d(0,5) i d(0,1):

d(0,5) - predstavlja promjer čestica za koji vrijedi da 50 % ukupnog broja čestica ima promjer veći od tog promjera i 50 % ukupnog ima promjer manji od tog promjera. Ova vrijednost poznata je kao „*mass median diameter*“ ili medijan volumne raspodjele.

d(0,1) - predstavlja veličinu čestice od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka.

d(0,9) - predstavlja veličinu čestica od koje je manje 90 % čestica cijelog uzorka.

3.5.3.5. Određivanje teksturalnih svojstava čokolada

Uzorci čokolada bili su podvrgnuti analizi tvrdoće, izražene kao sila probijanja, na uređaju za ispitivanje teksture TA.HD.plus. 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. Da bi se postigao maksimalni omjer kompresije i smicanja, za probijanje uzoraka korištena je cilindrična čelična sonda P/2 (Stable Micro Systems, UK) s ravnim dnom, promjera 2 mm. Dubina prodiranja podešena je na 10 mm uz brzinu prodiranja od 0,5 mm s⁻¹. Dobiveni dijagrami obrađeni su u Texture Exponent programu (Stable Mirco Systems, UK).

3.5.3.6. Određivanje svojstava taljenja čokolada

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) provedena je na uređaju Mettler Toledo DSC 823^e 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.

3.5.3.7. Senzorska analiza čokolada

Senzorska analiza čokolada provedena je po metodi ISO 8589-2007. Senzorsku analizu provodio je interni panel Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji se sastojao od 10 članova starosti između 20 i 50 godina. Čokolade su servirane na sobnoj temperaturi te su im ocjenjivani parametri izgleda (boja, sjaj i površina), akustičnosti (lom), teksture (taljenje) te okusa (slatko, slano, gorko i biljno) koristeći ocjene od 1 do 9, pri čemu ocjena 1 označava nizak intenzitet parametra, a ocjena 9 izrazito visoki intenzitet. Opća prihvatljivost proizvoda ocjenjivana je hedonističkom skalom od 1 do 9, pri čemu 1 označava izrazito nepoželjan proizvod, a 9 izrazito poželjan.

3.5.4. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička obrada rezultata provedena je u programu Statistica (v.14, TIBCO Software Inc.) koristeći Studentov t-test i jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je formulirati liposomalne dozirne sustave polifenolnih spojeva ekstrakta haritakija te njihova inkorporacija u čokoladu. Ekstraktu haritakija određena su bioaktivna svojstva, a formuliranim liposomima fizikalna svojstva, inkapsulacijska učinkovitost, antioksidacijski kapacitet i kinetika otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave. Pripremljeni liposomalni inkapsulat, dodan je u čokoladu u udjelu od 10 % te su novoformuliranim čokoladama određena bioaktivna, reološka, fizikalna, teksturalna i senzorska svojstva.

4.1. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA HARITAKIJA

Bioaktivna karakterizacija ekstrakta haritakija uključivala je određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta DPPH i ABTS metodama. Rezultati su prikazani u tablici 4. Svi rezultati izraženi su po gramu suhe tvari, koja je za ispitivani uzorak iznosila 96,29 %.

Tablica 4. Udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakta haritakija

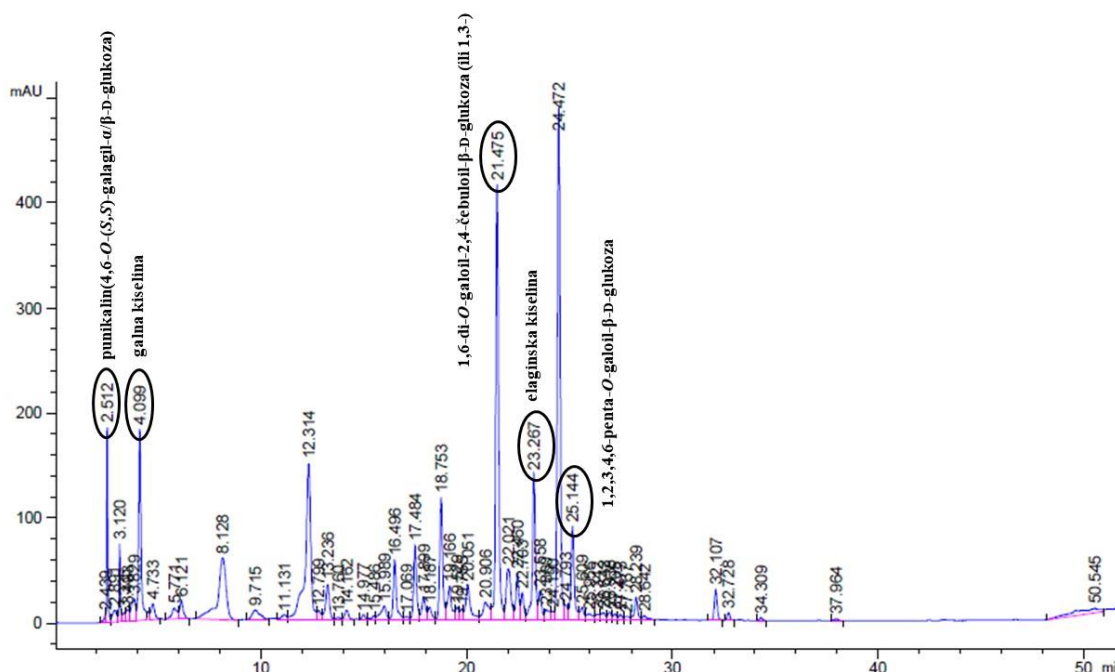
Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g ⁻¹ s. tv.)	Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox g ⁻¹ s. tv.)	
	DPPH	ABTS
457,69 ± 0,74	6,34 ± 0,10	6,03 ± 0,28

EGK-ekivalenti galne kiselina; s.tv.-suha tvar

Udjel ukupnih polifenola ekstrakta haritakija iznosio je 457,69 mg EGK g⁻¹ s. tv., a antioksidacijski kapacitet 6,34 i 6,03 mmol Trolox g⁻¹ s. tv. Venkatesan i sur. (2017) provodili su ekstrakciju polifenolnih spojeva kore haritakija koristeći heksan, kloroform, etilni acetat, aceton, metanol i vodu kao otapala, a najveću ekstrakcijsku učinkovitost odredili su u metalnom ekstraktu (143,41 μg ekvivalenta rutina mL⁻¹). Nadalje, Kumar i sur. (2018) odredili su visoki antioksidacijski kapacitet alkoholnog ekstrakta haritakija s izmjerenim IC₅₀ vrijednostima (koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju danoga parametra) od 2,27 μg mL⁻¹ (ABTS metoda) i 6,04 μg mL⁻¹ (DPPH metoda). Prema Saha i sur. (2011), visoki antioksidacijski kapacitet haritakija proizlazi iz prisutnosti hidroksicimetnih kiselina, derivata hidroksibenzojevih kiselina, flavonol aglikona i njihovih glikozida.

Nadalje, u ovome istraživanju, provedena je identifikacija pojedinačnih polifenolnih spojeva koristeći HPLC-PDA i LC-MS/MS metodologiju. Kromatogram uzorka snimljen PDA detektorom pri valnoj duljini od 260 nm prikazan je na slici 6. Primjenom HPLC-PDA

metodologije identificirane su galna i elaginska kiselina (tablica 5), dok je za identifikaciju dodatna tri derivata galne kiseline primijenjena LC-MS/MS metodologija.



Slika 6. Kromatogram ekstrakta haritakija, uz označene identificirane polifenolne spojeve, snimljen PDA detektorom pri 260 nm

Od derivata galne kiseline identificirani su punikalin(4,6-O-(S,S)-galagil- α/β -D-glukoza, 1,6 (ili 1,3)-di-O-galoil-2,4-čebuloil- β -D-glukoza i 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glukoza, a njihovi udjeli prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva u ekstraktu haritakija

Polifenolni spoj	Udjel spoja (mg g ⁻¹ s. tv.)
*Punikalin(4,6-O-(S,S)-galagil- α/β -D-glukoza	10,62
Galna kiselina	23,49
*1,6 (ili 1,3)-di-O-galoil-2,4-čebuloil- β -D-glukoza	61,92
Elaginska kiselina	6,93
*1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glukoza	15,32

s.tv.-suha tvar; * kvantificirani koristeći galnu kiselinu kao standard

Juang i sur. (2004) identificirali su 14 polifenolnih spojeva u haritakiju, uključujući galnu kiselinu (6,72 mg g⁻¹), čebulaninsku kiselinu (8,65 mg g⁻¹), punikalin (38,07 mg g⁻¹), čebulanin (11,63 mg g⁻¹), korilagin (13,80 mg g⁻¹), neočebulinsku kiselinu (13,05 mg g⁻¹), elaginsku kiselinu

(24,44 mg g⁻¹), čebulaginsku kiselinu (57,89 mg g⁻¹), čebulininsku kiselinu (21,61 mg g⁻¹) i 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil-β-D-glukožu (14,54 mg g⁻¹), a udjel ukupnih polifenola iznosio je 210,40 mg g⁻¹. Također, Pfundstein i sur. (2010) proveli su identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva u metanolnom ekstraktu haritakija. Kao i u ovome istraživanju, identificirana je galna kiselina (3,68 mg g⁻¹), penta-*O*-galoil glukoza (3,51 mg g⁻¹) i elaginska kiselina (4,08 mg g⁻¹). Osim navedenih spojeva, identificirali su i di-*O*-galoil glukožu (11,98 mg g⁻¹), tri-*O*-galoil glukožu (3,09 mg g⁻¹), tetra-*O*-galoil glukožu (6,52 mg g⁻¹), tri-*O*-galoil-šikiminsku kiselinu (3,26 mg g⁻¹), čebulanin (7,17 mg g⁻¹), metil neočebulanin (2,18 mg g⁻¹), čebulaginsku kiselinu (24,17 mg g⁻¹), čebulinsku kiselinu (4,00 mg g⁻¹), metil neočebulagat (7,14 mg g⁻¹), metil neočebulinat (9,01 mg g⁻¹), korilagin (13,80 mg g⁻¹) i punikalagin (11,22 mg g⁻¹).

4.2. LIPOSOMALNA INKAPSULACIJA

4.2.1. Fizikalna karakterizacija liposoma

Fizikalna karakterizacija liposoma uključivala je određivanje veličine, indeksa polidisperzije i zeta potencijala, a rezultati su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Fizikalna karakterizacija liposoma

Uzorak	Veličina (nm)	Indeks polidisperzije	Zeta potencijal (mV)
Prazni liposomi (PL)	874,80 ± 11,91 ^{bc}	0,66 ± 0,12	-12,03 ± 0,87 ^{bc}
Liposomalni inkapsulat - 50 mg (L_50)	545,83 ± 11,54 ^{ac}	0,63 ± 0,02	-17,60 ± 0,29 ^{ac}
Liposomalni inkapsulat - 100 mg (L_100)	514,07 ± 11,09 ^{ab}	0,59 ± 0,03	-14,23 ± 0,29 ^{ab}

a-statistički značajna razlika u odnosu na PL ($p < 0,05$); b-statistički značajna razlika u odnosu na L_50 ($p < 0,05$); c-statistički značajna razlika u odnosu na L_100 ($p < 0,05$). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey post-hoc test.

Veličina praznih liposoma iznosila je 874,80 nm, dok je veličina liposomalnog inkapsulata s 50 mg uzorka iznosila 545,83 nm, a veličina liposomalnog inkapsulata sa 100 mg uzorka 514,07 nm. Iz dobivenih vrijednosti može se primijetiti da se povećanjem mase ekstrakta unutar liposoma statistički značajno ($p < 0,05$) smanjuje njihova veličina. Prema broju lipidnih dvoslojeva, liposomi se karakteriziraju kao jednoslojni (svih dimenzija), višeslojni (> 500 nm) i multivezikularni (> 1000 nm) (Guimarães i sur., 2021). Liposomi korišteni u ovom istraživanju,

prema tome, pripadaju skupini višeslojnih liposoma, zbog svoje veličine koja je veća od 500 nm kod svih uzorka.

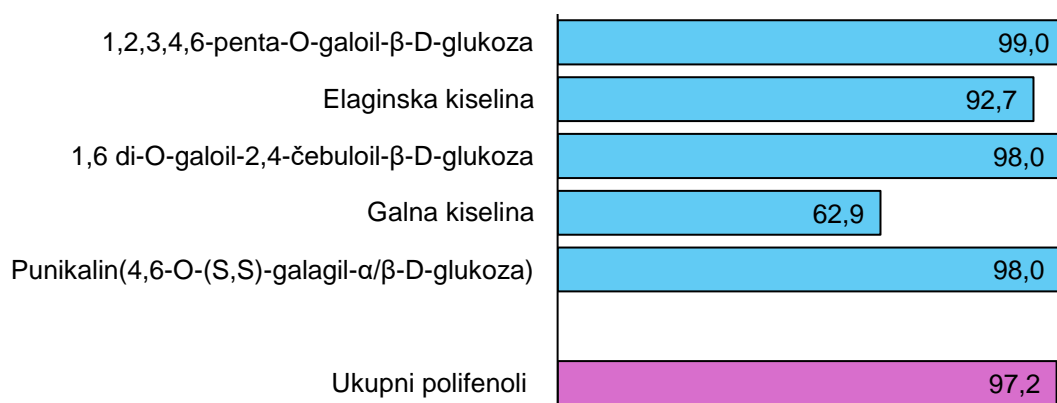
Indeks polidisperzije ukazuje na raspodjelu veličine čestica liposoma i vrijednosti su u rasponu od 0 do 1, pri čemu niže vrijednosti ukazuju na njihovu homogeniju raspodjelu (Guimarães i sur., 2021). Indeks polidisperzije u ovome istraživanju iznosio je oko 0,6 kod svih analiziranih uzoraka i nije uočena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između ispitivanih uzoraka. Danaei i sur. (2018) navode kako vrijednost indeksa polidisperzije iznad 0,7 pokazuje da uzorak ima vrlo široku distribuciju veličine čestica. Kod nosača na bazi lipida, kao što su liposomi i formulacije nanoliposoma, PDI od 0,3 i niže se smatra prihvatljivim (Putri i sur., 2017; Badran i sur., 2014; Chen i sur., 2011). Unatoč tome, posljednje izdanje „Smjernica za industriju“ Američke agencije za hranu i lijekove ne navodi kriterije za prihvatljiv indeks polidisperzije kada je riječ o lijekovima koji koriste liposome kao nosače (FDA, 2018). Nadalje, vrijednost zeta potencijala indicira stabilnost koloidnog sustava. Povećanjem zeta potencijala, povećava se odbijanje između čestica što dovodi do stabilnije koloidne disperzije. Ako sve čestice u suspenziji imaju veliki negativni ili pozitivni zeta potencijal one će se odbijati i neće stvarati tendenciju prema aglomeriranju (Mady i sur., 2012). Zeta potencijal u ovom istraživanju iznosio je -12,03 mV za prazne liposome (PL), -17,60 mV za liposome koji sadrže 50 mg ekstrakta (L_50) te 14,23 mV za liposome koji sadrže 100 mg ekstrakta (L_100) haritakija. Kod ispitivanih uzoraka, uočena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u vrijednostima zeta potencijala. Na vrijednost zeta potencijala može utjecati temperatura, viskoznost, pH vrijednost, ionska jakost te površinske karakteristike liposoma. Čak i male varijacije navedenih parametara mogu značajno promijeniti njegovu vrijednost (Smith i sur., 2017). Kao opće pravilo smatra se da zeta potencijal $\geq \pm 30$ mV i $\leq \pm 60$ mV predstavlja izvrsnu stabilnost (Samimi i sur., 2018; Sikora i sur., 2015; Honary i sur., 2013;). Zeta potencijal liposoma $\geq \pm 30$ mV ukazuje na monodisperzne formulacije bez agregata (Gumustas i sur., 2018), dok su liposomi sa zeta potencijalom ± 20 mV manje stabilni. Svi ostali sustavi, sa zeta potencijalom manjim od ± 5 mV teže brzoj agregaciji (Honary i sur., 2013). Prema zeta potencijalu analiziranih uzoraka, može se zaključiti da se radi o stabilnom sustavu čija je stabilnost kratkotrajna. Nemeth i sur. (2022) uspjeli su povećati stabilnost liposoma dodatkom membranskih aditiva koji daju naboj, kao što su stearylamin i diacetil fosfat. Površinska modifikacija liposoma može se izvesti na dva načina, ugradnjom površinskih aktivnih tvari poput žučnih soli ili Tween 80 ili prevlačenjem površine polimerima kao što su kitozan i polietilen glikol (Nguyen i sur., 2016).

4.2.2. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti

Inkapsulacijska učinkovitost vrlo je važan parametar u procjeni uspješnosti inkapsulacijskog postupka i odnosi se na udio aktivnog spoja koji je uspješno zadržan u inkapsulacijskom

sustavu. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola određena je za oba pripremljena inkapsulata – L_50 i L_100, i iznosila je, redom, 97,26 i 97,24 %. Pošto inkapsulacijska učinkovitost između inkapsulata nije bila statistički značajno ($p > 0,05$) različita, za sve daljnje eksperimente, korišten je uzorak L_100 pošto je sadržavao više inkapsuliranog ekstrakta (100 mg) nego uzorak L_50 (50 mg) s jednakom inkapsulacijskom učinkovitošću ukupnih polifenola.

Inkapsulacijska učinkovitost za pojedinačne identificirane polifenolne spojeve ekstrakta haritakija u uzorku L_100 prikazana je na slici 7.



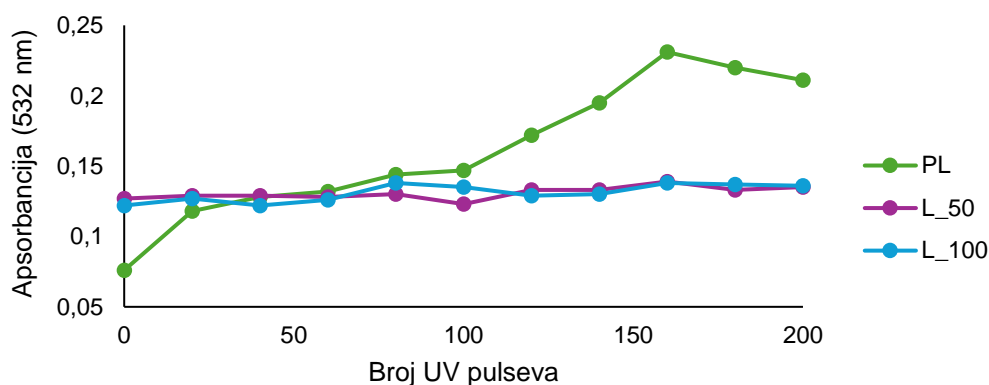
Slika 7. Inkapsulacijska učinkovitost (%) ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva ekstrakta haritakija u uzorku L_100

Svi identificirani polifenolni spojevi, izuzev galne kiseline, pokazali su izrazito visoku inkapsulacijsku učinkovitost ($> 90\%$). Galna kiselina je izrazito polaran polifenolni spoj, što je vidljivo i iz kromatograma ekstrakta haritakija (slika 6), pošto se eluira u kratkom vremenu kod kromatografije obrnutih faza, primijenjene u ovome radu, čime se može objasniti njeno manje zadržavanje (62,9 %) u inkapsulacijskom sustavu. Zanimljivo je istaknuti da je punikalin(4,6-O-(S,S)-galagil- α/β -D-glukoza po retencijskom vremenu polarniji od galne kiseline, a zadržan je u visokom udjelu (98,0 %) u liposomalnom inkapsulacijskom sustavu. Među dostupnom znanstvenom literaturom, nisu dostupni podaci o liposomalnoj inkapsulaciji bioaktivnih spojeva haritakija, ali primijenjene su druge tehnike. Tako su primjerice, Kumar Jha i sur. (2024) inkapsulirali bioaktivne spojeve haritakija ionskim geliranjem, koristeći natrijev alginat kao nosač, te liofilizacijom, koristeći binarne sustave nosača zeina i škroba. Isti autori zabilježili su veću inkapsulacijsku učinkovitost ekstrakta od 75,95 %, primjenom liofilizacije uz škrob kao nosač, dok je ionsko geliranje, uz natrijev alginat kao nosač, rezultiralo nižom inkapsulacijskom učinkovitošću od 56,06 %. Nadalje, u radu Varma i sur. (2019) provedena je inkapsulacija bioaktivnih spojeva haritakija koristeći fitosome koji su pripremljeni koristeći različite omjere fosfolipida, kolesterola i alkoholnog ekstrakta haritakija. Najveća inkapsulacijska učinkovitost,

od 77,56 %, zabilježena je pri omjeru fosfolipida i kolesterola 1,5:1,2 uz dodatak 1 % alkoholnog ekstrakta haritakija.

4.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta TBARS metodom

Tiobarbiturni test korišten je za utvrđivanje zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta haritakija nakon inkapsulacije u liposomalni sustav, a praćen je određivanjem koncentracije malondialdehida, kao markera lipidne peroksidacije (Petlevski i sur., 2006). Rezultati su prikazani na slici 8 i vidljivo je da je kod oba liposomalna inkapsulata (L_50 i L_100) stvaranje malondialdehida bila znatno manje u usporedbi s praznim liposomima (uzorak PL). Nakon UV zračenja od 200 pulseva, stvaranje malondialdehida bilo je 1,55 puta manje u liposomalnim inkapsulatima (L_50 i L_100) nego u praznim liposomima (PL).

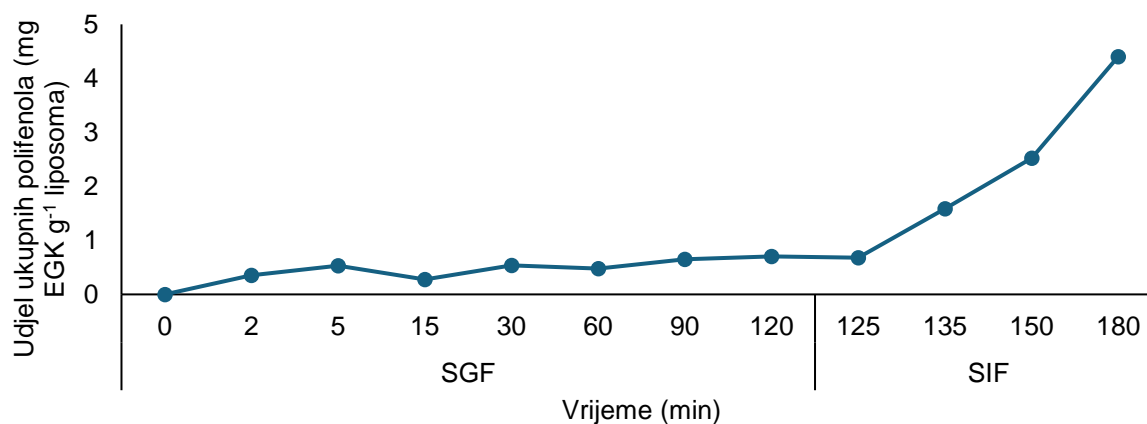


Slika 8. Utjecaj inkapsuliranog ekstrakta haritakija na intenzitet UV-inducirane lipidne peroksidacije, određen TBARS metodom.

Ventekatesan i sur. (2017) također su objavili značajnu antioksidacijsku aktivnost alkoholnog ekstrakta haritakija u inhibiciji lipidne peroksidacije moždanog tkiva pri čemu su odredili IC_{50} vrijednost od $271,76 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je, za usporedbu, salicilna kiselina imala IC_{50} vrijednost od $137,73 \mu\text{g mL}^{-1}$. Autori su zaključili da je snažna antioksidacijska aktivnost ekstrakta haritakija u inhibiciji peroksidacije lipida rezultat prisustva polifenolnih spojeva.

4.2.4. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave

Kinetika otpuštanja polifenola iz liposoma (uzorak L_100) u uvjetima simulirane probave, uključujući želučanu (SGF) i intestinalnu (SIF) fazu, prikazana je na slici 9.



Slika 9. Kinetika otpuštanja polifenola iz liposomalnog inkapsulata (uzorak L_100) u uvjetima simulirane probave

Prema dobivenim rezultatima, otpuštanje polifenola iz liposoma u želučanoj fazi bilo je izrazito sporo što je i očekivano s obzirom da nizak pH i prisutnost pepsina u SGF-u nemaju značajan utjecaj na strukturu liposoma (Rowland i sur., 1980). Otpuštanje polifenola je postalo brže u intestinalnoj fazi jer žučne soli i pankreatin u SIF-u utječu na fizikalne karakteristike i morfologiju liposoma uslijed 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, olakšanog prisutnošću žučnih soli, što je doprinijelo oslobađanju inkapsuliranog albumina iz liposoma. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da je količina ekstrakta oslobođenog iz liposoma za vrijeme želučane faze vrlo mala, što ukazuje da liposomi u želučanom okruženju ostaju stabilni. Liposomi na ovaj način pridonose boljoj apsorpciji i većoj bioraspoloživosti polifenola u tankom crijevu.

4.3. FORMULACIJA ČOKOLADA

Pripremljena su dva uzorka čokolade – kontrolni uzorak, pripremljen bez dodatka inkapsulata, i uzorak pripremljen uz dodatak liposomalnog inkapsulata (uzorak L_100) u udjelu od 10 %. Novoformuliranim čokolada određen je bioaktivni sastav, raspodjela veličine čestica, reološka, teksturalna i senzorska svojstva te svojstva taljenja.

4.3.1. Karakterizacija bioaktivnog sastava čokolada

Bioaktivna karakterizacija čokolada uključivala je određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta, a rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta čokolada

Uzorak	Udjel ukupnih polifenola (mg EGK g ⁻¹)	Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox g ⁻¹)	
		DPPH	ABTS
Uzorak Č_K	22,95 ± 0,33*	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,00
Uzorak Č_L	17,38 ± 0,08*	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,00

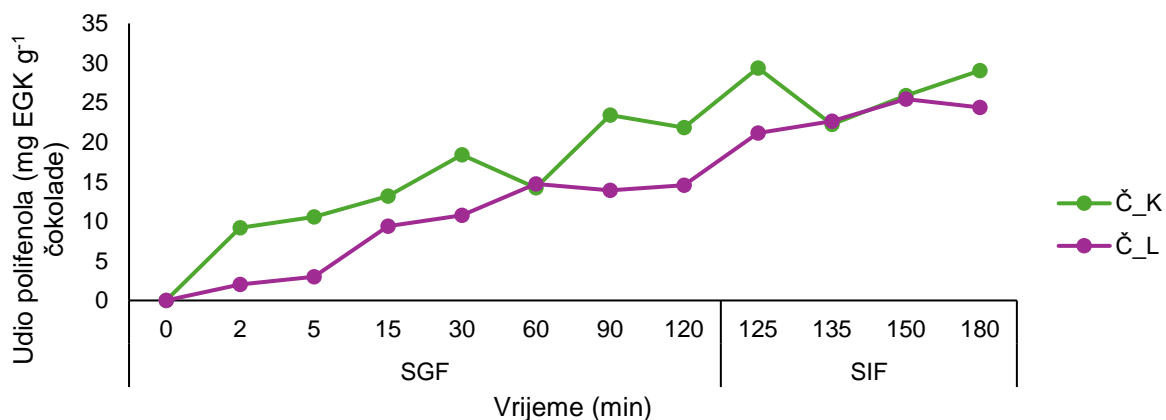
EGK-ekivalenti galne kiseline; *-statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između uzoraka određena t-testom.

Kontrolni uzorak čokolade (Č_K), pripremljen bez dodatka liposomalnog inkapsulata, sadržavao je 22,95 mg EGK g⁻¹ polifenola i shodno tome visoki antioksidacijski kapacitet (0,10 i 0,11 mmol Trolox g⁻¹). Kontrolni uzorak sadržavao je 75 % kakaovih dijelova (poglavlje 3.5.3.) što objašnjava njegov bogati bioaktivni sastav (Da Silva i sur., 2015). U uzorku pripremljenom s dodatkom liposomalnog inkapsulata (Č_L), određen je niži udjel ukupnih polifenola od 17,38 mg EGK g⁻¹, a jednaki antioksidacijski kapacitet (0,11 mmol Trolox g⁻¹). Kao što je rečeno, kontrolni uzorak čokolade sadržavao je visoki udjel kakaovih dijelova, a time i veći udio polifenola po masi, u usporedbi s liposomima, ali unatoč tome, kao posljedica visokog antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta haritakija, isti nije bio promijenjen dodatkom liposomalnog inkapsulata u čokoladu.

Postoji veliki broj istraživanja s temom obogaćivanja čokolada polifenolnim spojevima s obećavajućim rezultatima. Tako su primjerice, Sim i sur. (2016) dodatkom praha osušenog perikarpa mangostina u udjelu od 3 % povećavali ukupni udio polifenola u tamnoj čokoladi za 13 %. Belščak Cvitanović i sur. (2013) pokazali su da dodatak koncentriranih i liofiliziranih biljnih ekstrakata stolisnika, koprive i lista masline u udjelu od 3 % također povećava udio ukupnih polifenolnih spojeva čokolade. Također, u istome istraživanju, čokolade obogaćene biljnim ekstraktima pokazale su veći udjel ukupnih polifenola nakon 12 mjeseci skladištenja u odnosu na čokoladne mase bez dodatka ekstrakta. Polinski i sur. (2021) zabilježili su povećanje antioksidacijskog kapaciteta, udjela ukupnih polifenola i biorasploživosti dodatkom 5 % liofiliziranog ekstrakta aronije u tamnu čokoladu. Ova istraživanja upućuju na to da obogaćivanje čokolade polifenolnim spojevima može biti održiva strategija za poboljšanje njezinih funkcionalnih svojstava.

4.3.2. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola čokolada u uvjetima simulirane probave

Praćenje kinetike otpuštanja polifenola u uvjetima simulirane probave provedeno je kod kontrolnog uzorka čokolade (Č_K) i onog s dodatkom liposomalnog inkapsulata (Č_L), u cilju provjere zadržavanja mogućnosti kontinuiranog i kontroliranog otpuštanja polifenolnih spojeva inkapsulata i nakon inkorporacije u prehrambeni proizvod. Rezultati su prikazani na slici 10.



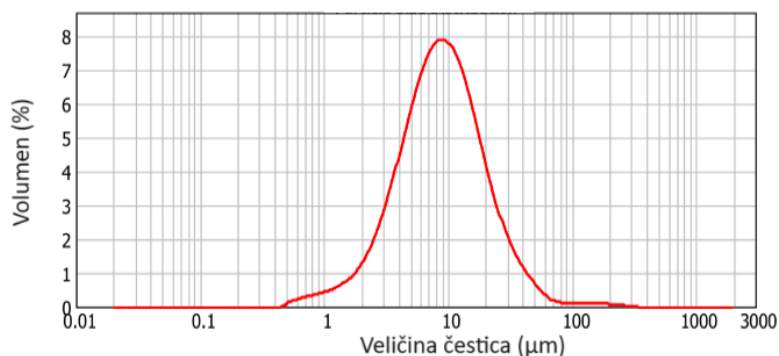
EGK-ekivalenti galne kiseline

Slika 10. Praćenje kinetike otpuštanja polifenola iz čokolada u uvjetima simulirane probave

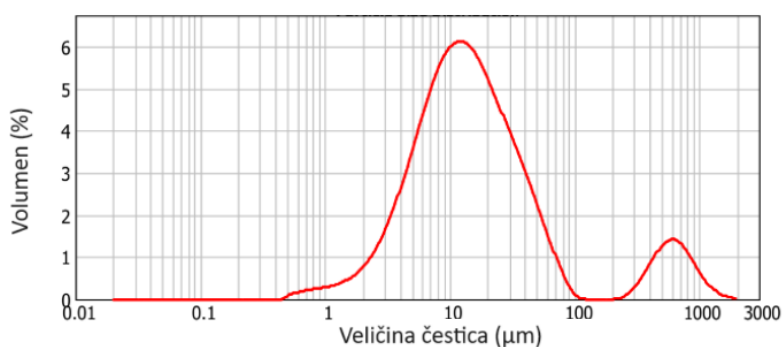
Kod uzorka čokolada s dodanim liposomalnim inkapsulatom (Č_L), uočeno je kontinuirano i kontrolirano otpuštanje polifenola tijekom simulirane probave u želucu i takom crijevu, što znači da je inkapsulacijski sustav uspješno inkorporiran u matriks čokolade. Usporedno s time, kod kontrolnog uzorka čokolada (Č_K), uočeno je brže i manje kontrolirano otpuštanje polifenola u želučanoj fazi što upućuje na daljnju slabiju apsorpciju polifenola u tankom crijevu, a time i njihovu manju bioraspodjivost. Čokolade se najčešće obogaćuju polifenolnim spojevima inkorporacijom različitih biljnih ekstrakata te je primjerice, u radu Šeremet (2024) provedena uspješna inkorporacija liposomalnog ekstrakta dobričice u čokoladu vidljiva također postizanjem kontroliranog i kontinuiranog otpuštanja polifenolnih spojeva u uvjetima simulirane probave u želucu i tankom crijevu.

4.3.3. Raspodjela veličine čestica u uzorcima čokolada

Raspodjela veličine čestica u čokoladi ima značajan utjecaj na teksturu, profil taljenja, kristalizaciju i senzorska svojstva. Dijagrami raspodjele veličine čestica u čokoladama prikazani su na slikama 11 i 12, a parametri raspodjele veličine čestica ($d(0,1)$, $d(0,5)$ i $d(0,9)$) u tablici 8.



Slika 11. Raspodjela veličine čestica za kontrolni uzorak čokolade bez liposomalnog inkapsulata (uzorak Č_K)



Slika 12. Raspodjela veličine čestica za uzorak čokolade s liposomalnim inkapsulatom (uzorak Č_L)

Tablica 8. Parametri raspodjele veličine čestica (μm) čokolada

Uzorak	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Č_K	3,04	8,75	23,90
Č_L	4,04	14,01	74,15

Prema parametru $d(0,1)$, 90 % čestica uzorka Č_K veće je od 3,04 μm , a kod uzorka Č_L veće je od 4,04 μm . Parametar $d(0,5)$, kao najmjerodavniji pokazatelj veličine čestica, razlikuje se kod uzorka čokolada, te kod uzorka Č_L iznosi 14,01 μm , a kod uzorka Č_K 8,75 μm . Ovaj parametar, koji se još naziva i medijan volumne raspodjele, ukazuje na to da liposomalni inkapsulat utječe na povećanje veličine čestica. Također, kod parametra $d(0,9)$ primjetne su veće varijacije između čokolada te je tako vrijednost parametra $d(0,9)$ kod uzorka Č_K 23,90 μm , a uzorka Č_L 74,15 μm . S obzirom na sve parametre raspodjele veličine čestica, može se primijetiti da je veličina čestica uzorka Č_K u rasponu od finih (18 μm) do grubih čestica (50 μm), što zadovoljava rasponu minimalno i maksimalno dopuštenih veličina čestica čokolade, dok je kod uzorka Č_L, prema vrijednosti $d(0,9)$, 10 % čestica veće od 74,15 μm (Ziegler i

Hogg, 2009; Beckett, 2000). Također, prema Sim i sur. (2016), poželjna je veličina čestica manja od 30 μm jer one rezultiraju „ugodnim“ osjećajem čokolade u ustima, što u ovome slučaju, ide u korist čokoladi bez dodatka liposomalnog inkapsulata.

U radu Belščak-Cvitanović (2013) mjerena je raspodjela veličine čestica čokolada s 30 %, 38 % i 72 % kakaovih dijelova koje su obogaćene liofiliziranim ekstraktima stolisnika, koprive i lista masline u udjelima od 1 i 3 %. U istome radu uočeno je da jedino dodatak liofiliziranog ekstrakta lista masline u čokoladu s 72 % kakaovih dijelova nije utjecao na parametre $d(0,1)$ i $d(0,5)$, ali je utjecao na parametar $d(0,9)$. Parametar $d(0,9)$ kod čiste čokoladne mase iznosio je 53,90 μm , a kod čokoladne mase obogaćene s 1 % ekstrakta lista masline 74,44 μm .

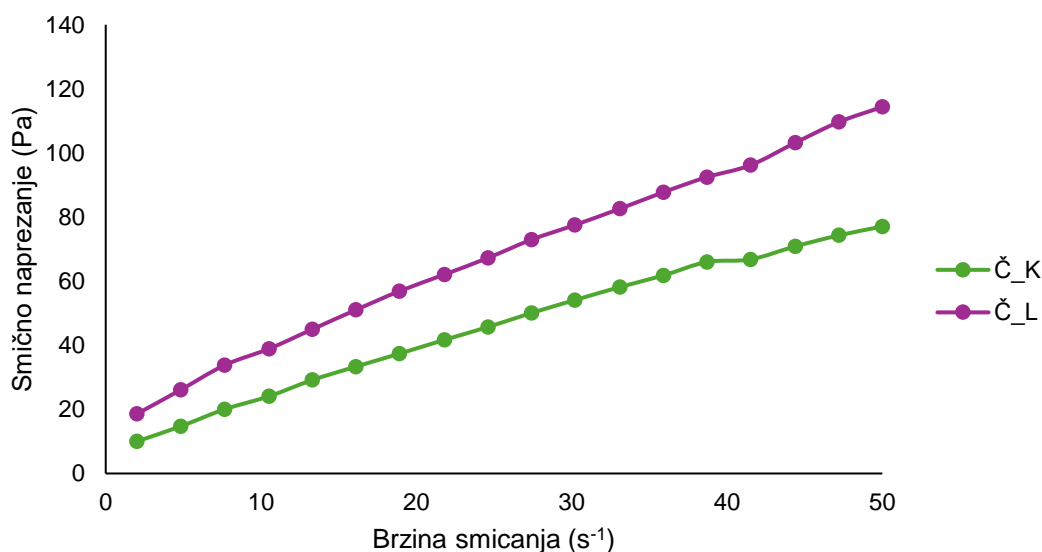
4.3.4. Određivanje reoloških svojstava čokolade

Reološka svojstva čokolade najviše ovise o raspodjeli veličine čvrstih čestica i samoj formulaciji, odnosno udjelu pojedinih sastojaka, kao i 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). Vrijednosti Casson-ove granice tečenja i plastične viskoznosti prikazane su u tablici 9, a krivulje tečenja i viskoznosti čokolada na slikama 13 i 14.

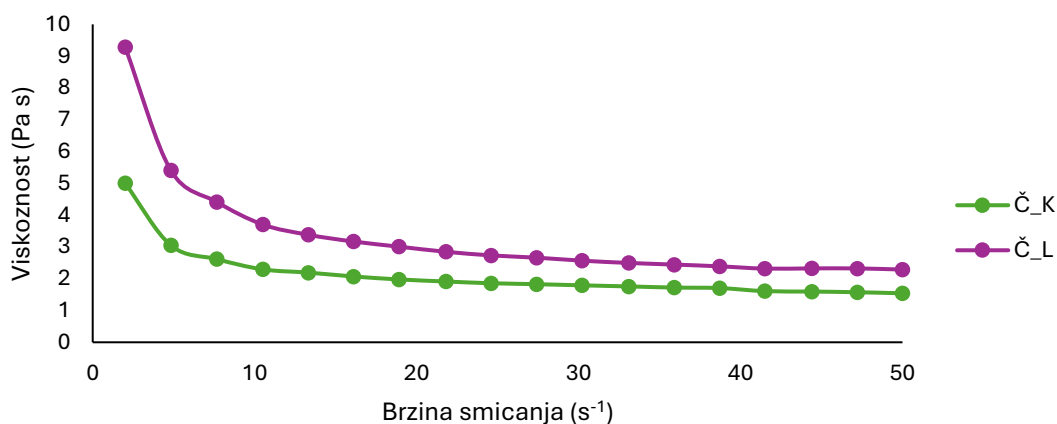
Tablica 9. Reološka svojstva novoformuliranih čokolada

Uzorak	Casson-ova granica tečenja (Pa) – τ_0	Casson-ova plastična viskoznost (Pa s) – η_c
Č_K	2,78 ± 0,06*	1,04 ± 0,02*
Č_L	7,21 ± 0,09*	1,25 ± 0,02*

*-statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između uzoraka određena t-testom.



Slika 13. Krivulja tečenja formuliranih čokolada



Slika 14. Krivulja viskoznosti formuliranih čokolada

Uzorci čokolada su prema krivuljama tečenja (slika 13) i krivuljama viskoznosti (slika 14) 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. Vrijednost Casson-ove granice tečenja za kontrolni uzorak K_Č iznosila je 2,78 Pa, a dodatak liposomalnog inkapsulata u čokoladu uzrokovao je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje granice tečenja te je ona za uzorak Č_L iznosila 7,21 Pa. Veća vrijednosti granice tečenja u uzorku Č_L može značiti da su u tom uzorku ostvarene snažnije interakcije između sastojaka u odnosu na uzorak Č_K. Casson-ova viskoznost za kontrolni uzorak (Č_K) iznosila je 1,04 Pa s te se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovala od vrijednosti utvrđene za uzorak Č_L (1,25 Pa s). Prema Aeschlimann i Beckett (2000), očekivane vrijednosti Casson-ove plastične viskoznosti za mliječne čokolade su u rasponu od 2 do 6 Pa s i za tamne čokolade od 2 do 4 Pa s, dok su očekivane vrijednosti granice tečenja za mliječne čokolade u rasponu od 2 do 18 Pa, a za tamne čokolade od 4 do 32 Pa. Dakle, dobiveni rezultati u ovome istraživanju u skladu su s očekivanim vrijednostima.

4.3.5. Određivanje tvrdoće čokolada

Od teksuralnih svojstava, novoformuliranim čokoladama određena je tvrdoća i rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Tvrdoća (izražena kao sila probijanja) čokolada

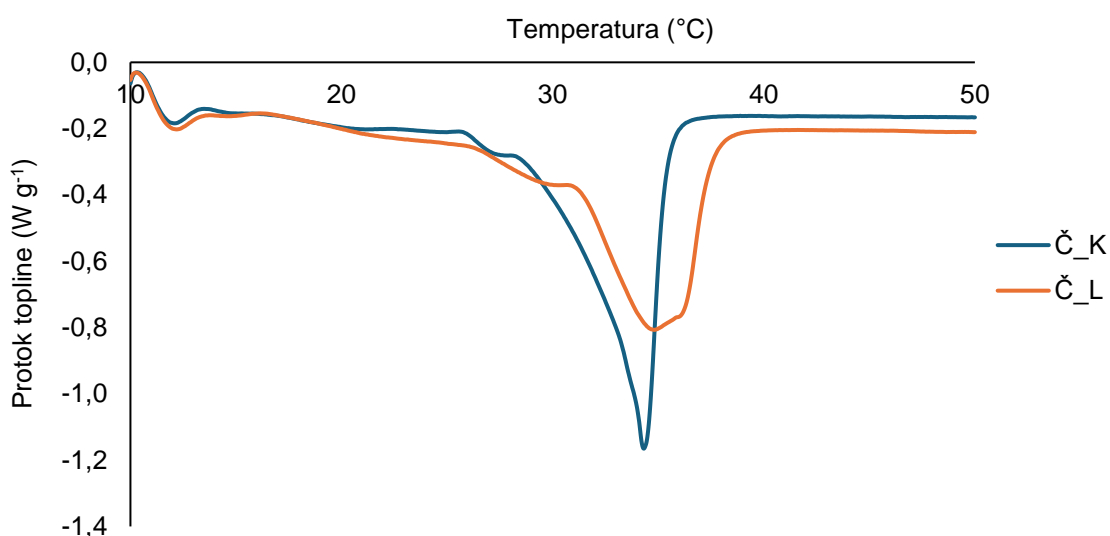
Uzorak	Tvrdoća [N]
Č_K	30,86 ± 2,70
Č_L	30,39 ± 0,34

*-statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između uzoraka određena t-testom.

Tvrdoća kontrolnog uzorka čokolade (uzorak Č_K) iznosila je 30,86 N, a onog s dodatkom liposomalnog inkapsulata (uzorak Č_L) 30,39 N. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da dodatak liposomalnog inkapsulata nije statistički značajno ($p > 0,05$) utjecao na tvrdoću čokolade. U radu Šeremet (2024), dodatak liposomalnog inkapsulata ekstrakta dobričice, u udjelu od 4 %, uzrokovao je smanjenje tvrdoće čokolade s 18286,75 g na 14100,37 g i navedeno je da manja tvrdoća čokolade upućuje na prisutnost slabije mrežne strukture, odnosno na čokolade osjetljivije na lomljenje. Također, autorica navodi da je mogući uzrok smanjenja tvrdoće korištenje fosfolipida s izrazito visokim udjelom 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. Unatoč tome, taj učinak u ovome istraživanju nije uočen.

4.3.6. Određivanje svojstava taljenja čokolade

Termogrami uzoraka čokolada u obliku DSC krivulja prikazani su na slici 15, a parametri taljenja za oblik V (β_2) kakaovog maslaca prikazani su u tablici 11.



Slika 15. DSC termogrami formuliranih čokolada

Tablica 11. 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	34,3 ± 0,1	47,36 ± 1,3*
Č_L	34,8 ± 0,0	34,8 ± 0,7*

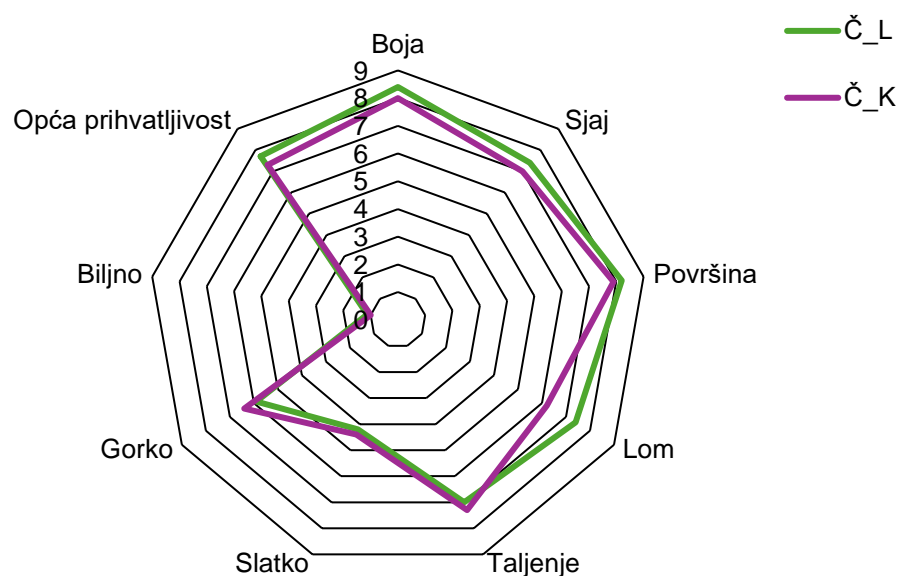
*-statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između uzoraka određena t-testom.

Na krivuljama taljenja uzoraka čokolada (DSC termogrami) primijećen je 1 endotermni pik. Oštri pik primijećen je kod oba uzorka u uskom rasponu maksimalne temperature taljenja 34,3 °C (Č_K) do 34,8 °C (Č_L) i predstavlja taljenje najpoželjnijeg polimornog oblika kakaovog maslaca - oblik V (β_2). S obzirom na dominaciju oblika V kakaovog maslaca, može se zaključiti da je proces temperiranja oba uzorka čokolada proveden ispravno. Premda dodatak inkapsulata u čokoladu nije rezultirao statistički značajnom ($p > 0,05$) promjenom u maksimalnoj temperaturi taljenja oblika V kakaovog maslaca, promjene u entalpiji taljenja (ΔH_f) bile su statistički značajne ($p < 0,05$) te se pokazalo da je količina energije potrebna za taljenje kontrolnog uzorka Č_K iznosila 47,36 J g⁻¹, a količina energije potrebna za taljenje uzorka Č_L 34,8 J g⁻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 (Afoakwa, 2016).

U radu Didar (2020) praćena je promjena u temperaturi taljenja i entalpiji taljenja kod uzoraka čokolada u koje je dodan inkapsulat nara u koncentracijama od 1,2,3,4 i 5 grama na 200 g bijele čokolade. Inkapsulacija je provedena korištenjem pektina i želatine kao nosača. Dobiveni rezultati ukazali su na blagi pad temperature taljenja i promjene entalpije taljenja s povećanjem koncentracije dodanog inkapsulata. Kod uzoraka s najmanjom dodanom koncentracijom inkapsulata nara, temperatura taljenja je iznosila 34,0 °C, a kod uzorka s najvećom dodanom koncentracijom 32,8 °C.

4.3.7. Određivanje senzorskih svojstava čokolada

Senzorska analiza čokolada iznimno je bitna kod procjene uspješnosti procesa razvoja visokokvalitetnih čokoladnih proizvoda koji zadovoljavaju preferencije potrošača. U ovome istraživanju, čokoladama su ocijenjeni parametri izgleda (boja, sjaj i površina), akustičnosti (lom), teksture (taljenje), okusa (slatko, gorko i biljno) i opća prihvatljivost. Rezultati senzorskog ocjenjivanja prikazani su na slici 16.



Slika 16. Senzorska analiza uzoraka čokolade s dodanim inkapsulatom (Č_L) i čokolade bez dodatka inkapsulata (Č_K)



Slika 17. Proizvedena čokolada s liposomalnim inkapsulatom

Oba uzorka čokolade ocijenjena su visokim ocjenama za parametre izgleda. Ocjena za boju kod kontrolnog uzorka (Č_K) iznosila je 8,0, a kod čokolade s dodatkom liposomalnog inkapsulata (Č_L) 8,4. Sjaj i površina čokolada također su bile ocijenjene sličnim ocjenama, odnosno 7,0 i 7,9 za uzorak Č_K i 7,4 i 8,2 za Č_L. Visoke ocjene parametra izgleda upućuju na to da je provedena dobra homogenizacija liposomalnog inkapsulata u matriks čokolade te da nema razlike u izgledu (slika 17). Intenzitet loma ocijenjen je višom ocjenom kod uzorka Č_L (7,4), u usporedbi s uzorkom Č_K (6,2). Pošto se intenzitet loma vrlo često povezuje s tvrdoćom, zanimljivo je istaknuti da, unatoč različitim ocjenama intenziteta loma, tvrdoća

uzoraka čokolada nije bila statistički značajno ($p>0,05$) različita (poglavlje 2.4.). Nadalje, intenzitet taljenja ocijenjen je sličnim ocjenama kod oba uzoraka čokolada (7,3 i 7,0) što upućuje na činjenicu da dodatak liposomalnog inkapsulata nije utjecaj na profil taljenja čokolade. Čokolade su ocijenjene relativno niskim ocjenama za slatki okus (4,4 i 4,2) što je i očekivano s obzirom na nizak udjel šećera u recepturi (15 %), dok su ocjene za gorki okus nešto više (6,4 i 5,9), također očekivano, s obzirom na visoki udjel kakaovih dijelova u recepturi (84 %). Biljni okus ekstrakta haritakija uspješno je „zamaskiran“ inkapsulacijom, ali i inkorporacijom u čokoladu, pošto je biljni okus u oba uzorka čokolada ocijenjen s vrlo niskim ocjenama (1,0 i 1,1). Obje čokolade bile su dobro prihvaćene od strane članova panela, a veću ocjenu za opću prihvatljivost dobio je uzorak Č_L (7,7) u usporedbi s Č_K (7,3).

U radu Didar (2021), prema rezultatima senzorske analize, inkorporacija liposomalnog inkapsulata vitamina D ($5 \mu\text{g } 10 \text{ g}^{-1}$ čokolade) u čokoladu nije uzrokovala promjene u parametrima izgleda i okusa. Također, u radu Tolve i sur. (2018) provedena je inkorporacija mikroinkapsulata fitosterola u koncentracijama od 5, 10 i 15 % u čokoladu s 85 % kakaovih dijelova, a prilikom senzorske analize, najmanja razlika u prihvatljivosti, u odnosu na kontrolni uzorak, uočena je kod uzorka pripremljenog s 5 % mikroinkapsulata. Kod ocjenjivanja parametara izgleda i okusa, zabilježene su značajne razlike u intenzitetu boje, taljenja, zrnatosti i trpkosti kod svih dodanih koncentracija, pri čemu je čak i najmanja koncentracija utjecala na senzorske parametre. U istraživanju Sim i sur. (2016) provedena je inkorporacija praha perikarpa mangostina u koncentracijama od 1, 2 i 3 % u čokoladu te prema senzorskoj analizi nisu uočene značajne razlike kod parametara okusa, poput gorčine, kakaovog okusa, slatkoće i naknadnog okusa. Jedino je kod čokolade obogaćene dodatkom 3 % ekstrakta uočena povećana zrnatost, što može biti rezultat povećanja veličine čestica uzrokovanog dodatkom ekstrakta.

5. ZAKLJUČCI

1. U ekstraktu haritakija određeni su derivati galne kiseline te je potvrđen visoki antioksidacijski kapacitet.
2. Liposomalna inkapsulacija ekstrakta haritakija rezultirala je visokom inkapsulacijskom učinkovitošću ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva, kao i visokim zadržavanjem antioksidacijskog potencijala.
3. U uvjetima simulirane probave liposomalni inkapsulati su pokazali stabilnost u želučanoj fazi, a u intestinalnoj fazi došlo je do narušavanja njihove strukture i do otpuštanja inkapsuliranih polifenolnih spojeva.
4. Formulirana čokolada je zbog visokog udjela kakaovih dijelova (75 %) imala visok udio polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet, a dodatak liposomalnog inkapsulata, u udjelu od 10 %, nije utjecao na povećanje udjela ukupnih polifenola.
5. U uvjetima simulirane probave, kod čokolade s dodatkom liposomalnog inkapsulata, uočeno je kontinuirano i kontrolirano otpuštanje polifenolnih spojeva, dok je kod kontrolnog uzorka čokolade otpuštanje bilo brže i manje kontrolirano.
6. Dodatak liposomalnog inkapsulata u čokoladu rezultirao je čokoladom poželjnog profila taljenja, s izrazito prihvatljivim teksturalnim, reološkim i senzorskim svojstvima.

6. LITERATURA

Abedini A, Dakhili S, Bazzaz S, Moghaddam SK, Mahmoudzadeh M, Andishmand H (2023) Fortification of chocolates with high-value-added plant-based substances: Recent trends, current challenges, and future prospects. *Food Sci Nutr* **11**, 3686-3705. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3334>

Aeschlimann JM, Beckett ST (2000) International inter-laboratory trials to determine the factors affecting the measurement of chocolate viscosity. *J Texture Stud* **31**, 541-576. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2000.tb01019.x>

Afoakwa EO, Peterson A, Fowler M (2007) Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - A review. *Trends Food Sci Tech* **18**, 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.02.002>

Afoakwa, E.O. (2016) *Chocolate Science and Technology*, 2.izd., Wiley Blackwell, Oxford

Afshari AR, Sadeghnia HR, Mollazadeh H (2016) A review on potential mechanisms of *Terminalia chebula* in Alzheimer's disease. *Adv Phar Sc* **1**, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2016/8964849>

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hnifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Let* **8(1)**, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-102>

Ashkezary MR, Yeganehzad S, Vatankhah H, Todaro MA, Maghsoudlou Y (2018) Effects of different emulsifiers and refining time on rheological and textural characteristics of compound chocolate. *Ital J Food Sci* **30**, 26-36. <https://doi.org/10.14674/IJFS-759>

Badran M Formulation and in vitro evaluation of flufenamic acid loaded deformable liposome for improved skin delivery. *Digest J Nanomater Bios* **9**, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100151>

Barreira JC, Ferreira IC, Oliveira MBP, Pereira JA (2008) Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem* **107(3)**, 1106-1113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.030>

Bangham AD, Horne RW (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol* **8**, 660-668. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7)

Beckett ST (2000) *The Science of Chocolate*. RSC Paperbacks, Cambridge.

Beckett, ST (2017) *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. U: Ziegler GR, Hogg R (ured.) Particle size reduction. Wiley-Blackwell, West Sussex, str. 216-240

Belščak-Cvitanović A (2013) Utjecaj dodatka polifenolnih ekstrakata biljnoga podrijetla na funkcionalna svojstva čokolade. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

- Belščak-Cvitanović A, Komes D, Benković M, Karlović S, Hećimović I, Ježek D, Bauman I (2012) Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Res International* **48**, 820-830. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.023>
- Bozzuto G, Molinari A (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomed* **2015**, 975-999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* **28**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bulbul MRH, Chowdhury MNU, Naima TA, Sami SA, Imtiaj MS, Huda N, Uddin MG. (2022) A comprehensive review on the diverse pharmacological perspectives of *Terminalia chebula* Retz. *Heliyon* **8**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10220>
- Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W (2017) Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharm* **9**, 2-12 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Çagdas M, Sezer AD, Bucak S (2014) Application of Nanotechnology in Drug Delivery, 1.izd, IntechOpen, London, str. 1-50
- Carvalho JCS, Romoff P, Lannes SCS (2018). Improvement of nutritional and physicochemical properties of milk chocolates enriched with kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and grape (*Vitis vinifera*). *Food Sci Technol* **38(3)**, 551-560. <http://doi.org/10.1590/fst.15018>
- Chen M, Liu X, Fahr (2011) A Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int J Pharm* **408**, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.006>
- Chen X, Sun F, Ma L, Wang J, Qin H, Du G (2011) In vitro evaluation on the antioxidant capacity of triethylchebulate, an aglycone from *Terminalia chebula* Retz fruit. *Indian J Pharmacol* **43(3)**, 320. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81508>
- Charcosset C, El-Harati A, Fessi H (2005) Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J Control Release* **108**, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.07.023>
- Danaei MRMM, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani, A, Mozafari MR (2018) Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharm* **10(2)**, 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Da Silva Medeiros N, Koslowsky Marder R, Farias Wohlenberg M, Funchal C, Dani C (2015) Total phenolic content and antioxidant activity of different types of chocolate, milk, semisweet, dark, and soy, in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of wistar rats. *Biochem Res Int* **1**, 294659 <https://doi.org/10.1155/2015/294659>
- Desai KGH, Park HJ (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry Technol* **23**, 1361– 1394. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>
- Deshmukh SA, Waghmar MB, Labhan NM, Gaikwad DK (2013) Leaf morphometric studies in the genus *Terminalia* L. from Kolhapur district. *J Bot* **2(2)**, 1-3.

Didar Z (2020) Characterization of white chocolate enriched with free or encapsulated pomegranate extract. *J Nutr* **8**, 302-309. <https://doi.org/10.22038/jnfh.2020.50603.1281>

Didar Z (2021) Enrichment of dark chocolate with vitamin D3 (free or liposome) and assessment quality parameters. *J Food Sci Technol* **58(8)**, 3065-3072. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04810-x>

Didar Z (2024). Characterization of white chocolate enriched with co-encapsulated *Lactobacillus acidophilus* (La-5) and rose hip shell fruit extract: Characterization, probiotic viability during storage, and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Science & Nutrition*, **12(2)**, 890-906. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3805>

Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Nutr Metab* **3**, 51-55. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-3-2>

Gessner DK, Ringseis R, Eder K (2017) Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J Animal Physiol Animal Nutr* **101(4)**, 605–628. <https://doi.org/10.1111/jpn.12579>

Gupta, PC (2012) Biological and pharmacological properties of *Terminalia chebula* Retz.(Haritaki)-An overview. *Int J Pharm Pharm Sci* **4**, 62-68.

Dolatowska-Żebrowska K, Ostrowska-Ligęza 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. *J Thermal Analysis Calorimetry* **138**, 2769-2779. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08181-0>

Eun JB, Maruf A, Das PR, Nam SH (2020) A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze-drying. *Food Sci Nutr* **60**, 3547-3572. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1698511>

Euliss LE, DuPont JA, Gratton S, DeSimone J (2006) Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine. *Chem Soc Rev* **35(11)**, <https://doi.org/1095-1104.10.1021/ar2000315>

Faccinnetto-Beltrán P, Gómez-Fernández AR, Santacruz A, Jacobo-Velázquez DA (2021) Chocolate as Carrier to Deliver Bioactive Ingredients: Current Advances and Future Perspectives. *Foods* **10**, 2065. <https://doi.org/10.3390/foods10092065>

Feng XH, Xu HY, Wang JY, Duan S, Wang YC, Ma CM (2021) In vivo hepatoprotective activity and the underlying mechanism of chebulinic acid from *Terminalia chebula* fruit. *Phytomedicine: Int Journal Phytotherapy Phytopharmacol* **83**, 153479. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153479>

Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S (2014) Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Sci Eng* **41**, 178–195. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.049>

FDA (2018). Liposome Drug Products; Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; Labeling Documentation. Guidance for Industry;

Pharmaceutical Quality/CMC.; U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Silver Spring, MD, USA.

Florez-Mendez J, Flórez JY, Pérez E, Lares M (2019) Effect of the consumption of chocolate enriched with tryptophan and resveratrol on biochemical markers and oxidative stress in a healthy population. *Vitae* **26**, 8-16. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v26n1a02>

GAIN (2016) Consumer food-patterns of food expenditures and imports in Croatia, USDA Foreign Agricultural Service, GAIN Report Number: HR1602.

Godočikova L, Ivanišova E, Kačanjova M (2017) The influence of fortification of dark chocolate with sea buckthorn and mulberry on the content of biologically active substances. *Adv Lif Sci*, **1(1)**, 26-31 <https://doi.org/10.1515/arls-2017-0004>

Goldoni L (2004.) Tehnologija konditorskih proizvoda- kakao i čokolada, Kugler, Zagreb

Guimarães D, et al. (2021) Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int J Pharm* **601**, 120571. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>

Gumustas M, Sengel-Turk CT, Gumustas A, Ozkan SA, Uslu B (2017). Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems; Elsevier Inc., Amsterdam, str. 67-108

Honary S, Zahir F (2013) Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). *Trop J Pharm Res* **12**, 265–273. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>

Innova marketing insights (2023) Chocolate trends: Global market overview, <https://www.innovamarketinsights.com/trends/chocolate-trends/> Pristupljeno 11. lipnja 2024.

IOCCC (2000) Viscosity of cocoa and chocolate products (Analytical method: 46).

ISO 8589:2007, Sensory analysis – General guidelines for the design of test rooms.

Jalil AMM, Ismail A (2008) Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules* **13**, 2190–2219. <https://doi.org/10.3390/molecules13092190>

Juang LJ, Sheu SJ, Lin TC (2004) Determination of hydrolyzable tannins in the fruit of *Terminalia chebula* Retz. by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Sep Sci*, **27(9)**, 718–724. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401741>

Karn PR, Cho W, Hwang SJ (2013) Liposomal drug products and recent advances in the synthesis of supercritical fluid-mediated liposomes. *Nanomed* **8(9)**, 1529-1548 <https://doi.org/10.2217/nnm.13.131>.

Katz DL, Doughty K, Ali A (2011) Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* **15**, 2779–2811. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>

Khan RS, Grigor J, Winger R, Win A (2013) Functional food product development – Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends Food Sci Technol* **30**, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.004>

- Khan MRUZ, Yanase E, Trivedi V (2023) Extraction, phytochemical characterization and anti-cancer mechanism of Haritaki churna: An ayurvedic formulation. *Plos one*, **18(5)**: e0286274, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286274>
- Kim HL, Choi BK, Yang SH (2022) *Terminalia chebula* Medicinal Uses: A Review of *in vitro* and *in vivo* Studies. *Biotechnol Bioprocess Eng* **27(5)**, 729-739. <https://doi.org/10.1007/s12257-022-0090-0>
- Krippendorff BF, Neuhaus R, Lienau P, Reichel A, Huisinga W (2009) Mechanism-based inhibition: deriving KI and kinact directly from time-dependent IC50 values. *SLAS Discovery* **14(8)**, 913-923. <https://doi.org/10.1177/1087057109336751>
- Kubola, J., Siriamornpun, S., & Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chem*, **126(3)**, 972-981.
- Kumar Jha A, Sit N (2024) Encapsulation of bioactive compounds extracted from haritaki pulp (*Terminalia chebula* Retzius): characterization of physical, thermal, and morphological properties. *Sustainable Food Technol* **2**, 362. <https://doi.org/10.1039/d3fb00131h>
- Kumar R, Arora R, Agarwal A, Gupta YK (2018) Protective effect of *Terminalia chebula* against seizures, seizure-induced cognitive impairment and oxidative stress in experimental models of seizures in rats. *J Ethnopharmacol* **215**, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.008>
- Larsson SC, Akesson A, Gigante B, Wolk A (2016) Chocolate consumption and risk of myocardial infarction: A prospective study and meta-analysis. *Heart* **102**, 1017-1022. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-309203>
- Lee DY, Yang H, Kim HW, Sung SH (2017) New polyhydroxytriterpenoid derivatives from fruits of *Terminalia chebula* Retz. and their α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* **27**, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.039>
- Lončarević I, Pajin B, Tumbas Šaponjac V, Petrović J, Vulić J, Fišteš A, Jovanović P (2019) Physical, sensorial and bioactive characteristics of white chocolate with encapsulated green tea extract. *J Sci Food Agricult* **99(13)**, 5834-5841. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9855>
- Lombardo, D., Calandra, P., Barreca, D., Magazù, S., Kiselev, M.A. (2016) Soft interaction in liposome nanocarriers for therapeutic drug delivery. *Nanomaterials* **6**, 125. <https://doi.org/10.3390/nano6070125>
- Li Y, Li Y, Chen J (2021) Screening and identification of acetylcholinesterase inhibitors from *Terminalia chebula* fruits based on ultrafiltration and ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microchem J*, **168**, 106438. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106>
- 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 Res Int* **48**, 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.017>
- 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 Chem* **175**, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.108>

Liu K, Chen YY, Pan LH, Li QM, Luo JP, Zha XQ (2022) Co-encapsulation systems for delivery of bioactive ingredients. *Food Res Int* **155**, 111073 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111073>

Mady MM, et al. (2012) Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *Physica Medica* **28(4)**, 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2011.10.001>

Mahesh R, Bhuvana S, Begum VMH (2009) Effect of *Terminalia chebula* aqueous extract on oxidative stress and antioxidant status in the liver and kidney of young and aged rats. *Cell Biochem Funct* **27(6)**, 358–363. <https://doi.org/10.1002/cbf.1581>

Martini S, Conte A, Tagliacruzchi D (2018) Comprehensive evaluation of phenolic profile in dark chocolate and dark chocolate enriched with Sakura green tea leaves or turmeric powder. *Food Res Int*, **112**, 1-16. doi:10.1016/j.foodres.2018.06.020 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.020>

McClements D, Lesmes U, (2009) Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci Technol* **20**,448-57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.006>

McGaw LJ, Rabe T, Sparg SG, Jäger AK, Eloff JN, Van Staden, J (2001) An investigation on the biological activity of Combretum species. *J Ethnopharmacol* **75**, 45–50. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00405-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00405-0)

Meure LA, Foster NR, Dehghani F (2008) Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review. *AAPS PharmSciTech* **9**, 798-809. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9097-x>.

Mignet N, Seguin J, Chabot GG (2013) Bioavailability of polyphenol liposomes: A challenge ahead. *Pharmaceutics* **5(3)**, 457-471. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030457>

Minekus M, et al. (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct* **5(6)**, 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>

Monteiro S, Dias J, Lourenço V, Partidário A, Lageiro M, Lampreia C, Fernandes J, Lidon F, Reboredo F, Alvarenga N (2023) Development of a Functional Dark Chocolate with Baobab Pulp. *Foods* **12**, 1711. <https://doi.org/10.3390/foods12081711>

Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Kumar Mishra R, Thomas S (2018) Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery. U: Samimi S, Maghsoudnia N, Eftekhari RB, Dorkoosh F (ured.) Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 47-76

Muhammad DRA, Tuenter E, Patria GD, 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 Chem* **340**, 127983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127983>

Nageswara R, Palaksha S, Satish S, Ravishankar S (2013) The effects of Ethanolic extract in dried fruits of *Terminalia chebula* on learning and memory in mice. *Asian J Biomed Pharm Sci* **3**, 59–62.

- Napagoda M, Wijesundara DSA (2022) Medicinal plants as sources of novel therapeutics: the history, present, and future. U: Napagoda & L. Jayasinghe (ured.) Chemistry of Natural Products: Phytochemistry and Pharmacognosy of Medicinal Plants. De Gruyter, Berlin, Germany, str. 1-18.
- Na MK, Bae KH, Kang SS, Min BS, Yoo JK, Kamiryo Y, Senoo Y, Yokoo S, Miwa N (2004) Cytoprotective effect on oxidative stress and inhibitory effect on cellular aging of *Terminalia chebula* fruit. *Phytotherapy Res* **18**, 737-741. <https://doi.org/10.1002/ptr.1529>
- Nemeth Z, Csoka I, Semani Jazani R, Sipos B, Haspel H, Kozma G i sur. (2022) Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. *Pharm* **14(9)**,1798. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091798>
- Nguyen TX, Huang L, Gauthier M, Yang G, Wang Q (2016) Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery. *Nanomed* **11**, 1169-1185 <https://doi.org/10.2217/nnm.16.9>
- Nigam M et al. (2020) Fruits of *Terminalia chebula* Retz.: A review on traditional uses, bioactive chemical constituents and pharmacological activities. *Phytotherapy Res*, **34(10)**, 2518-2533. <https://doi.org/10.1002/ptr.6702>
- Paranjape A, Sonawane S, Patil S (2021) Development of sugar free and fortified chocolates with D-optimal design approach. *J Food Eng Technol* **10**, 28–33. <https://doi.org/10.32732/jfet.2021.10.1.28>
- Pathak SS, Pradhan RC, Mishra S (2019) Physical characterization and mass modeling of dried *Terminalia chebula* fruit. *J Food Process Eng* **42(3)**, e12992. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12992>
- Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP (2015) New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews* **115**, 10938–10966. <https://doi.org/10.1021/acs>
- Pellati F, Bruni R, Righi D, Grandini A, Tognolini M, Prencipe FP, Poli F, Benvenuti S, Del Rio D, Rossi D (2013) Metabolite profiling of polyphenols in a *Terminalia chebula* Retzius ayurvedic decoction and evaluation of its chemopreventive activity. *J Ethnopharmacol* **147(2)**, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.02.025>
- Perrett S, Golding M, Williams P (1991) A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *J Pharm Pharmacol* **43**, 154-161. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb06657.x>
- Petlevski R et al. (2006) Koncentracija malondialdehida u NOD miševa tretiranih akarbozom. *Biochem Medica* **16(1)**, 43-49. <https://doi.org/10.11613/BM.2006.006>
- Pfundstein B et al. (2010) Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochem* **71(10)**, 1132-1148. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.018>
- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules26185523>

Poliński S, Topka P, Tańska M, Kowalska S, Czaplicki S, Szydłowska-Czeraniak 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. <https://doi.org/10.3390/antiox11040752>

Pradeep S, Patil S M, Dharmashekara C, Jain A, Ramu R, Shirahatti P S, Glossman-Mitnik D (2022). Molecular insights into the *in silico* discovery of corilagin from *Terminalia chebula* as a potential dual inhibitor of SARS-CoV-2 structural proteins. *J Biomol Struct Dyn*, **41(20)**, 10869–10884. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2158943>

Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima (2005) Narodne novine 73, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1440.html Pristupljeno 8. srpnja 2024.

Putri DC, Dwiastu R, Marchaban M, Nugroho AK (2017) Optimization of mixing temperature and sonication duration in liposome preparation. *J Sci Community*, **14**, 79–85. <https://doi.org/10.7454/psr.v14i2.4567>

Rakin M, Bulatović M, Zarić D, Krunić T, Lončarević I, Petrović J, Pajin B (2023) Influence of added whey proteins and hydrolysates on rheological and textural characteristics of milk chocolate. *Sage J* **6**, 610-618. <https://doi-org.ezproxy.nsk.hr/10.1177/10820132221103758>

Razavizadeh BM, Tabrizi P (2021) Characterization of fortified compound milk chocolate with microcapsulated chia seed oil. *Food Sci Technol* **150**, 111993. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111993>

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 Biol Med* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rowland RN, Woodley JF (1980) The stability of liposomes *in vitro* to pH, bile salts, and pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids Lipid Metab* **620**, 400-409. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(80\)90131-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(80)90131-9)

Saha PK, Patra PH, Pradhan NR, Dey R, Das S, Mandal TK. (2011) Effect of *Terminalia chebula* and *Terminalia bellerica* on wound healing in induced dermal wounds in rabbits. *Pharmacol* **2**, 235–241.

Seguin J, Brullé L, Boyer R, Lu YM, Ramos Romano M, Touil YS, Chabot GG (2013) Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. *Int J Pharm*, **444(1-2)**, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01>

Senthilkumar GP, Subramanian SP (2008) Biochemical studies on the effect of *Terminalia chebula* on the levels of glycoproteins in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *J Applied Biomed* **6**, 105–115 <https://doi.org/10.32725/jab.2008.014>

Sikora A, Bartczak D, Geißler D, Kestens V, Roebben G, Ramaye Y, Varga Z, Palmi M, Shard AG, Goenaga-Infante H (2015) A systematic comparison of different techniques to determine the zeta potential of silica nanoparticles in biological medium. *Anal Methods* **7**, 9835–9843. <https://doi.org/10.1039/C5AY02014J>

Singh A, Bajpai V, Kumar S, Kumar B, Srivastava M, Rameshkumar KB (2016) Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six *Terminalia* species by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with chemometric analysis. *Ind Crops Prod*, **87**, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.048>.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* **16**, 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

Sim SY, Ng JW, Ng WK, Forde CG, Henry CJ (2016) Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. *Food Chem* **200**, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.092>

Smith MC, Crist RM, Clogston JD, McNeil SE (2017) Zeta potential: A case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem* **409**, 5779–5787. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>

Srivastava P, Raut HN, Wagh RS, Puntambekar HM, Kulkarni MJ (2012) Purification and characterization of an antioxidant protein (~16kDa) from *Terminalia chebula* fruit. *Food Chem* **131(1)**, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.048>

Subramani T, Ganapathyswamy H (2020) An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. *J Food Sci Technol* **57(10)**, 3545-3555. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04360-2>

Šeremet D (2024) Funkcionalni potencijal dobričice (*Glechoma hederacea* L.) – karakterizacija sastava i bioloških učinaka, inkapsulacija i inkorporacija u čokoladu. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Tan TYC, Lim XY, Yeo JHH, Lee SWH, Lai NM (2021) The health effects of chocolate and cocoa: A systematic review. *Nutrients* **13**, 2909. <https://doi.org/10.3390/nu13092909>

Tastetomorrow (2023) The 3 hottest chocolate trends for 2024, <https://www.tastetomorrow.com/inspiration/The-3-hottest-chocolate-trends-for-2024>
Pristupljeno 11. lipnja 2024.

Tolve R, Condelli N, Caruso MC, Barletta D, Favati F, Galgano F (2018) Fortification of dark chocolate with microencapsulated phytosterols: Chemical and sensory evaluation. *Food & Function* **9(2)**, 1265-1273. <https://doi.org/10.1039/C7FO01822C>

Torchilin VP (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev Drug Discovery* **4**, 145-160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>

Vanić Ž (2012) Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farmaceutski glasnik* **68**, 391-400.

Varma K, Vishwakarma G, Pathak R (2019) Extraction phytochemical screening and development of phytosomes of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* Retz for hepato-protection. *J Drug Del Therap* **9(3)**, 397-406. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i3.2685>

Velderrain-Rodríguez GR, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala JF, Chen CYO, Robles-Sánchez M, Astiazaran-García H, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA (2014)

Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food Funct* **5**, 189-197. <https://doi.org/10.1039/c3fo60361j>

Venkatesan A, Kathirvel A, Prakash S, Sujatha V (2017) Antioxidant, antibacterial activities and identification of bioactive compounds from *Terminalia chebula* bark extracts. *Free Radicals Antiox* **7(1)**, 43-49. <https://doi.org/10.5530/fra.2017.1.7>

Wagner A, Vorauer-Uhl K, Katinger H, (2002) Liposomes produced in a pilot scale: Production, purification and efficiency aspects. *Eur J Pharm Biopharm* **54**, 213–219. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00062-0)

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. <https://doi.org/10.3390/nu9070688>

Zamani P, Momtazi-Borojeni AA, Nik ME, Oskuee RK, Sahebkar A (2018). Nanoliposomes as the adjuvant delivery systems in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* **233(7)**, 5189-5199. <https://doi.org/10.1002/jcp.26361>

Zarić D, Rakin M, Bulatović M, Krunic T, Lončarević I, Pajin B, Blaževska Z, (2024) Influence of added extracts of herbs (*Salvia lavandulifolia*, *Salvia officinalis*) and fruits (*Malpighia glabra*) on rheological, textural, and functional (AChE-inhibitory and antioxidant activity) characteristics of dark chocolate. *J Food Meas Charact*, **18(1)**, 772-782. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02210-1>

Zhang XR, Kaunda JS, Zhu HT, Wang D, Yang CR, Zhang YJ (2019) The genus *Terminalia* (Combretaceae): An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *Nat Prod Biopros* **9**, 357-392. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-00222-3>

Zuidam NJ, Nedovic V (2010) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. U: Wandrey C, Bartkowiak A, Harding, SE (ured.) Materials for encapsulation, 1. izd., Springer, New York, str. 31-100.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis