

Formuliranje nanovlakana polifenolnog ekstrakta trave ive (*Teucrium montanum* L.) uz binarne nosače na bazi pululana

Vuksan, Tea

Undergraduate thesis / Završni 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:159:901785>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivs 3.0 Unported](#)/[Imenovanje-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam**

Tea Vuksan
0058215040

**FORMULIRANJE NANOVLAKANA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA TRAVE IVE
(*TEUCRIUM MONTANUM* L.) UZ BINARNE NOSAČE NA BAZI PULULANA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: projekt „Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda“ financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost (IP-2019-04-5879)

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Formuliranje nanovlakana polifenolnog ekstrakta trave ive (*Teucrium montanum* L.) uz binarne nosače na bazi pululana
Tea Vuksan, 0058215040

Sažetak:

Trava iva (*Teucrium montanum* L.) je mediteranska biljna vrsta čija se duga povijest tradicionalne upotrebe u prevenciji i liječenju različitih oboljenja pripisuje biološki aktivnim spojevima, poput polifenolnih spojeva. Uzevši u obzir nedostatak literaturnih podataka o valorizaciji bioaktivnog sastava trave ive, cilj ovog rada bio je inkapsulirati polifenolni ekstrakt trave ive u formi nanovlakana korištenjem binarnih sustava polimernih nosača na bazi pululana i hidroliziranog kolagena, odnosno pululana i zeina, u omjerima 80:20, 60:40 i 40:60, primjenom tehnike elektroispredanja. Formuliranim nanovlaknima određena je učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola spektrofotometrijskom metodom te pojedinačnih feniletanoidnih glikozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-PDA), kao i morfološke karakteristike. Ehinakozid, teupoliozid, stahizozid A, poliumozid i verbaskozid određeni su kao najzastupljeniji polifenolni spojevi u ekstraktu trave ive. Osim formulacije PUL:KOL/40:60, sve preostale kombinacije nosača rezultirale su uspješno proizvedenim nanovlaknima ekstrakta trave ive, s inkapsulacijskom učinkovitošću iznad 80 %. Kombinacije pululana i zeina rezultirale su većim prosječnim promjetrom nanovlakana (131,60 – 187,16 nm) u odnosu na binarne sustave pululana i hidroliziranog kolagena (115,89 – 120,57 nm).

Ključne riječi: elektroispredanje; feniletanoidni glikozidi; polifenolni spojevi; trava iva

Rad sadrži: 31 stranice, 15 slika, 4 tablica, 60 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno- biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Ana Mandura Jarić, mag. ing.

Datum obrane: 16. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Formulation of nanofibers from the polyphenolic extract of mountain germander (*Teucrium montanum* L.) with pullulan - based binary polymer blends
Tea Vuksan, 0058215040

Abstract:

Mountain germander (*Teucrium montanum* L.) is a Mediterranean plant whose long traditional use for the prevention and treatment of various diseases is attributed to biologically active compounds, such as polyphenolic compounds. Considering the lack of literature data on the valorization of bioactive composition of mountain germander (MG), the aim of this work was to encapsulate the MG polyphenolic extract in the form of nanofibers using binary polymer carrier systems based on pullulan and hydrolyzed collagen, *i.e.* pullulan and zein, in ratios of 80:20, 60 :40 and 40:60, using electrospinning technique. The encapsulation efficiency of the total polyphenols by spectrophotometric method and the individual phenylethanoid glycosides by high performance liquid chromatography (HPLC-PDA) as well as the morphological properties were determined using the formulated nanofibers. Echinacoside, teupolioside, stachyoside A, polyumoside and verbascoside were determined to be the most abundant polyphenolic compounds in the MG extract. With the exception of the PUL:KOL/40:60 formulation, all other carrier combinations resulted in successfully produced nanofibers from MG extract, with an encapsulation efficiency of over 80 %. Combinations of pullulan and zein resulted in a larger average diameter of nanofibers (131.60 – 187.16 nm) compared to the binary system of pullulan and hydrolyzed collagen (115.89 – 120.57 nm).

Keywords: mountain germander, phenylethanoid glycosides, polyphenolic compounds, electrospinning, encapsulation efficiency

Thesis contains: 31 pages, 15 figures, 4 tables, 60 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Technical support and assistance: Ana Mandura Jarić, mag. ing.

Thesis defended: July 16, 2024

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. TRAVA IVA | 2 |
| 2.1.1. POLIFENOLNI SPOJEVI TRAVE IVE | 3 |
| 2.1.2. FENILETANOIDNI GLIKOZIDI | 5 |
| 2.2. TEHNIKE INKAPSULACIJE | 6 |
| 2.2.1. ELEKTROISPREDANJE | 6 |
| 2.2.2. NOSAČI ZA INKAPSULACIJU | 9 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 10 |
| 3.1. MATERIJALI | 10 |
| 3.1.1. UZORCI | 10 |
| 3.1.2. KEMIKALIJE | 10 |
| 3.1.3. APARATURA I PRIBOR | 11 |
| 3.2. METODE | 12 |
| 3.2.1. BIOAKTIVNA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA TRAVE IVE | 12 |
| 3.2.2. INKAPSULACIJA ELEKTROISPREDANJEM | 15 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 17 |
| 4.1. BIOAKTIVNA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA TRAVE IVE | 17 |
| 4.2. BIOAKTIVNA KARAKTERIZACIJA NANOVLAKANA | 18 |
| 4.3. MORFOLOŠKA ANALIZA NANOVLAKANA | 21 |
| 5. ZAKLJUČCI | 25 |
| 6. POPIS LITERATURE | 26 |

1. UVOD

Pored optimizacije nutritivnog profila prehrambenih proizvoda, sve je popularnija inkorporacija bioaktivnih sastojaka prirodnog podrijetla u prehrambene proizvode. Polifenoli predstavljaju najrašireniju skupinu nenutritivnih bioaktivnih spojeva, a brojna znanstvena istraživanja utvrdila su pozitivan učinak njihovog svakodnevnog unosa u prevenciji različitih kroničnih oboljenja. Aromatično i ljekovito bilje predstavlja jedan od najvažnijih izvora polifenola, te se u posljednjem desetljeću intenzivno istražuje u kontekstu funkcionalne hrane.

Trava iva (*Teucrium montanum* L.) je mediteranska biljna vrsta s tradicionalnom uporabom u liječenju različitih bolesti pri čemu se njena antioksidacijska, antimikrobna i protuupalna svojstva pripisuju polifenolnim spojevima, odnosno fenolnim kiselinama i njihovih derivatima te flavonoidima. Najčešće se koristi u obliku biljnih infuzija i tinktura, ili kao aromatizirajuće sredstvo.

Polifenolni spojevi imaju ograničenu tehnološku primjenu uslijed osjetljivosti na svjetlost i toplinu, ograničene topljivosti te nepoželjnog senzorskog profila (izražena trpkoca i gorčina).

Kako bi se ovi nedostaci prevladali, koriste se različite tehnike inkapsulacije (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Vrlo često se koriste tehnike sušenja raspršivanjem, ekstruzije, liposomalne inkapsulacije i koacervacije, a u posljednje vrijeme dosta se istražuje i elektroispredanje. Tehnike inkapsulacije zahtijevaju primjenu nosača pomoću kojeg će se bioaktivni spoj inkapsulirati, a često se, uz ugljikohidrate, odabiru i proteini zbog GRAS („generally regarded as safe“) statusa i lake probavljivosti u ljudskom probavnom traktu. Od proteina animalnog podrijetla, najčešće se koriste kolagen, kazein i proteini sirutke, dok su od biljnih najčešće upotrebljavani zein i proteini soje. Proteinski nosači često se miješaju s drugim polimernim materijalom, kako bi se poboljšala inkapsulacijska učinkovitost.

Cilj ovog rada je inkapsulacija polifenolnih spojeva trave ive (*T. montanum*), uz pomoć binarnih polimernih nosača na bazi pululana i zeina te pululana i kolagena primjenom elektroispredanja. Nakon uspješno proizvedenih nanovlakana, određeni su parametri inkapsulacijske učinkovitosti (udjel ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva) ekstrakta trave ive te je provedena njihova fizikalna i morfološka karakterizacija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRAVA IVA

Trava iva (lat. *Teucrium montanum*) je biljka iz roda *Teucrium*, podporodice Ajugoideae i porodice Lamiaceae (Stanković, 2020). Raste u obliku polugrma visine 5 - 20 cm i ima razgranate i tanke grančica sivosmeđe boje (Slika 1.). Cvjetovi su blijedožute boje duljine do 1,5 cm, udruženi u glavice (Kalodera i sur., 1996). Biljka cvate u periodu od lipnja do kolovoza, na kamenitim i sunčanim lokalitetima (Stanković i sur., 2020). Obično se nalazi u brdskim i pretplaninskim područjima južne Europe, Španjolske, Male Azije, Krima, a može se naći i u sjevernoj Europi. Trava iva je termofilna biljka te se u tim predjelima zadržava na toplijim, vapnenačkim tlima niže nadmorske visine (Kalodera i sur., 1996).

U Hrvatskom primorju visoko je cijenjena zbog ljekovitih svojstava (Łuczaj i sur., 2021). Najčešće se u tradicionalnoj medicini upotrebljava u obliku biljnih infuzija i dekokta za ublažavanje probavnih smetnji (Savić i sur., 2019), glavobolje (Jarić i sur., 2015a), liječenje žučnih oboljenja (Šarić-Kundalić i sur., 2011), jetrenih oboljenja (Menković i sur., 2011), pročišćavanje krvi, liječenje reume i artritisa te ublažavanje grčeva (Šarić-Kundalić i sur., 2010b). Trava iva najčešće se konzumira kao biljna infuzija, dekokt, likera, začim za aromatiziranje, te kao balzam (Stanković i sur., 2020).

Dosadašnja istraživanja upućuju na različite biološke učinke trave ive. U radu Stanković i sur. (2011) tako je detektiran antioksidacijski učinak metanolnog ekstrakta trave ive na staničnu liniju humanog karcinoma debelog crijeva HCT-116 (50 – 1000 µg/mL). Nadalje, zabilježen je protuupalni učinak etanolnog i acetonskog ekstrakta na modelni sustav proteina, kao i inhibicijski učinak na aktivnost enzima α -glukozidaze (Sailović i sur., 2024) te enzima acetilkolinesteraze (Bektašević i sur., 2023). Detektirana je i izražena antibakterijska aktivnost ekstrakta trave ive na Gram negativnim bakterijama *Azotobacter chlorococcum*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. Vulgaris*, *P. Aeruginosa* i *K. Pneumoniae* (Stanković i sur., 2012). Utvrđen je i imunomodulacijski učinak različitih frakcija diklormetanskog ekstrakta trave ive u vidu stimulacije proliferacije limfocita (Li i sur., 2023).

Teucrium je rod s 300 biljnih vrsta rasprostranjenih u Europi, Sjevernoj Africi i dijelovima Azije, a 96 % vrsta raste u mediteranskom području (Tutin i sur., 1972). Najčešće spominjana vrsta je *T. chamaedrys* s 34 istraživanja (od toga 13 iz Turske). Nešto manje je proučavana *T. polium* (23 istraživanja, najviše u Iranu i Turskoj), dok se na *T. montanum* provelo znatno manje istraživanja (ukupno 11).



Slika 1. Trava iva (*Teucrium montanum L.*) (Anonymous, 2006)

2.1.1. Polifenolni spojevi trave ive

Polifenoli su bioaktivni spojevi prisutni u značajnim udjelima u različitim dijelovima biljaka, s preko 8000 identificiranih spojeva. Imaju ulogu u brojnim fiziološkim procesima u biljkama, poput obrane u stanju biotičkog i abiotičkog stresa, strukturne izdržljivosti, zaštitne uloge od UV zračenja, ulogu u obojenju i okusu te kvaliteti (De La Rosa i sur., 2019). Polifenolni spojevi imaju aromatski prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa kao supstituenata na prstenu te se dijele na flavonoide (antocijanini, flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanonoli), fenolne kiseline (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina), tanine (hidrolizirani i kondenzirani), stilbene i lignane. Često im se zbog kemijske strukture i biokemijske aktivnosti pripisuju antioksidacijska, antimikrobna, antikancerogena i protuupalna svojstva te preventivne uloge u razvoju bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i slično (Zhang i sur., 2022).

U rodu *Teucrium* dosad je identificirano ukupno 78 polifenolnih spojeva (Stanković, 2020). U Tablici 1. prikazani su neki od polifenolnih spojeva identificiranih u travi ivi, a koji se mogu podijeliti na hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, feniletanoidne glikozide i flavonoide.

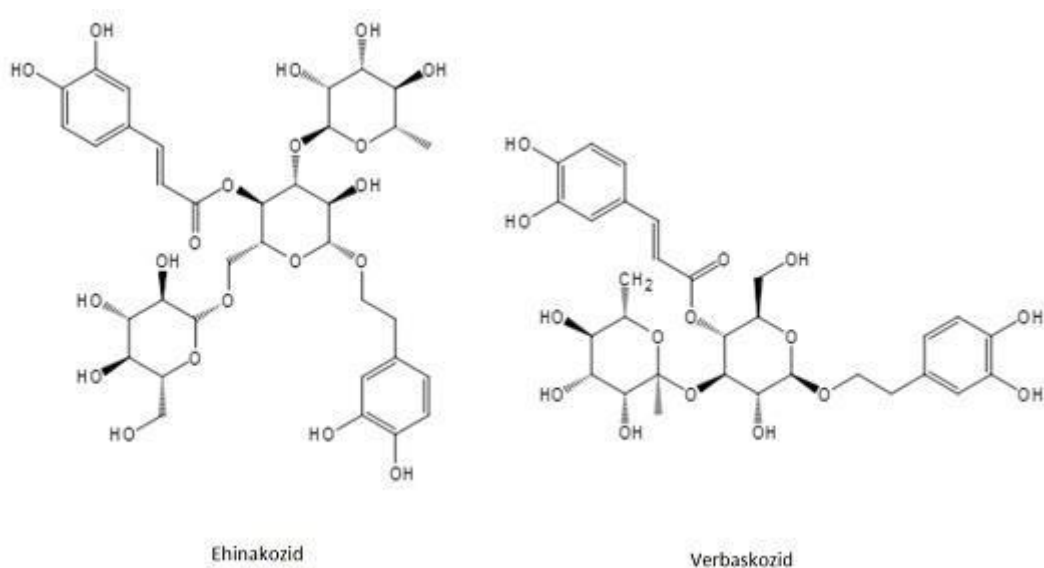
Tablica 1. Polifenolni spojevi identificirani u *T. montanum*

| Hidroksibenzojeve kiseline | Reference |
|----------------------------|--|
| elaginska | Bektašević i sur. (2023) |
| galna | Tumbas i sur. (2004), Nastić i sur. (2018), Bektašević i sur. (2023) |
| gentizinska | Tumbas i sur. (2004) |
| protokatehinska | Tumbas i sur. (2004), Nastić i sur. (2018) |
| siringinska | Tumbas i sur. (2004), Bektašević i sur. (2023) |
| vanilinska | Tumbas i sur. (2004), Nastić i sur. (2018) |
| Hidroksicimetne kiseline | Reference |
| ferulinska | Tumbas i sur. (2004), Nastić i sur. (2018), Stanković (2012), Bektašević i sur. (2023) |
| kafeinska | Tumbas i sur. (2004), Nastić i sur. (2018), Stanković (2012), Mitreski i sur. (2014), Bektašević i sur. (2023) |
| klorogenska | Stanković (2012), Bektašević i sur. (2023) |
| neoklorogenska | Mitreski i sur. (2014) |
| p-kumarinska | Tumbas i sur. (2004), Stanković (2012), Bektašević i sur. (2023) |
| ružmarinska | Stanković (2012), Bektašević i sur. (2023) |
| sinapinska | Tumbas i sur. (2004) |
| Feniletanoidni glikozidi | Reference |
| ehinakozid | Mitreski i sur. (2014), Sailović i sur. (2024), Šeremet i sur. (2022) |
| forzitozid A | Sailović i sur. (2024) |
| forzitozid B | Mitreski i sur. (2014) |
| izoverbaskozid | Sailović i sur. (2024) |
| kastanozid a | Mitreski i sur. (2014) |
| verbaskozid (akteozid) | Mitreski i sur. (2014), Sailović i sur. (2024), Šeremet i sur. (2022) |
| samiozid | Mitreski i sur. (2014) |
| Flavonoidi | Reference |
| apigenin | Mitreski i sur. (2014), Bektašević i sur. (2023) |
| cirsimaritin | Mitreski i sur. (2014), Harbourne (1986) |
| cirsilineol | Harbourne (1986) |
| cirsiriol | Mitreski i sur. (2014), Harbourne (1986) |
| diosmin | Sailović i sur. (2024) |
| diosmetin | Bektašević i sur. (2023) |
| epikatehin | Nastić i sur. (2018) |
| izokvercetin | Harbourne (1986), Sailović i sur. (2024) |
| kempferol | Bektašević i sur. (2023) |
| kempferol rutinozid | Sailović i sur. (2024) |
| kvercetin | Stanković (2012) |
| kvercitrin | Mitreski i sur. (2014) |
| miricetin | Stanković (2012), Bektašević i sur. (2023) |
| naringin | Nastić i sur. (2018) |
| naringenin | Bektašević i sur. (2023) |
| rutin | Nastić i sur. (2018), Stanković (2012), Harbourne (1986), Sailović i sur. (2024) |

2.1.2. Feniletanoidni glikozidi

Feniletanoidni glikozidi su derivati fenolnih kiselina esterificirani različitim brojem šećera, a što ima daje polarni karakter. Izolirani su iz svih dijelova biljaka. Kemijsku strukturu čini 2-feniletanol vezan na aldoheksozu (najčešće β -D-glukopiranozu) koja je esterificirana nekom fenolnom kiselinom (kafeinska, p-kumarinska, ferulinska kiselina i dr.), a na istu šećernu komponentu su dodatno vezani različiti monosaharidi poput ramnoze, ksiloze, arabinoze, aloze, galaktoze i apioze (Stanković, 2020). Obzirom na broj vezanih šećera, feniletanoidni glikozidi svrstavaju na: monosaharidne, disaharidne, trisaharidne, tetrasaharidne, pentasaharidne i dr. (Wu i sur., 2020). Izolirani su iz različitih porodica biljaka, poput Acanthaceae, Lamiaceae, Magnoliaceae, Oleaceae, Rosaceae i dr. (Xue i sur., 2018) te ih je do danas identificirano oko 572 (Wu i sur., 2020). Posjeduju mnoga biološki aktivna svojstva, poput antioksidacijskog (Li i sur., 2018), neuroprotektivnog (Hantraye i sur., 1993), antiupalnog (Wu i sur., 2020), antibakterijskog (Liu i sur., 2013), antivirusnog (Song i sur., 2016), antidijabetičkog učinka (Morikawa i sur., 2014) i dr. Prema dostupnim znanstvenim istraživanjima, u travi ivi su identificirani verbaskozid, izoverbaskozid, ehinakozid, kastanozid A, forzitozid A i B i samiozid (Mitreski i sur., 2014).

Zbog prisutnosti hidroksilnih skupina, te esterskih i glikozidnih veza, feniletanoidni glikozidi skloni su degradaciji pri izlaganju svjetlu, visokim temperaturama i lužnatim pH vrijednostima. Wu i sur. (2020) utvrdili su da se ukupni udjel feniletanoidnih glikozida ekstrahiranih iz cvjetova *Osmanthus fragrans* značajno smanjuje pri određenim uvjetima skladištenja. Nakon 90 dana pri 50 °C, udjel ukupnih feniletanoidnih glikozida smanjio se za 87 %, dok se nakon 7 dana pri 80 °C isti smanjio za 84,25 %. Povećanje pH vrijednosti s 5,0 na 9,0 pri sobnoj temperaturi ubrzalo je degradaciju verbaskozida (Vertuani i sur., 2011). Oyourou i sur. (2013) u svojem radu odredili su 43,2 % početnog udjela verbaskozida nakon 2 sata, odnosno 18,6 % početnog udjela verbaskozida nakon 4 sata izloženosti sunčevog svjetlu. U kontekstu biodostupnosti feniletanoidnih glikozida, na in vivo modelu je određena niska oralna bioraspoloživost te slaba apsorpcija ehinakozida u tankom crijevu (Li i sur., 2015). Uz bioraspoloživost, važne su i metaboličke transformacije kroz koje feniletanoidni glikozidi prolaze u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Li i sur. (2016) proučavali su stabilnost akteozida, izoakteozida i 2'-acetilakteozida u simuliranim želučanim i crijevnim uvjetima te njihov metabolizam pri djelovanju crijevnih bakterija. Akteozid se transformirao u čak jedanaest metabolita, izoakteozid u sedam metabolita, a 2'-acetilakteozid u jedanaest metabolita, uključujući hidroksitirozol, hidroksitirozol sulfat i kafeinsku kiselinu.



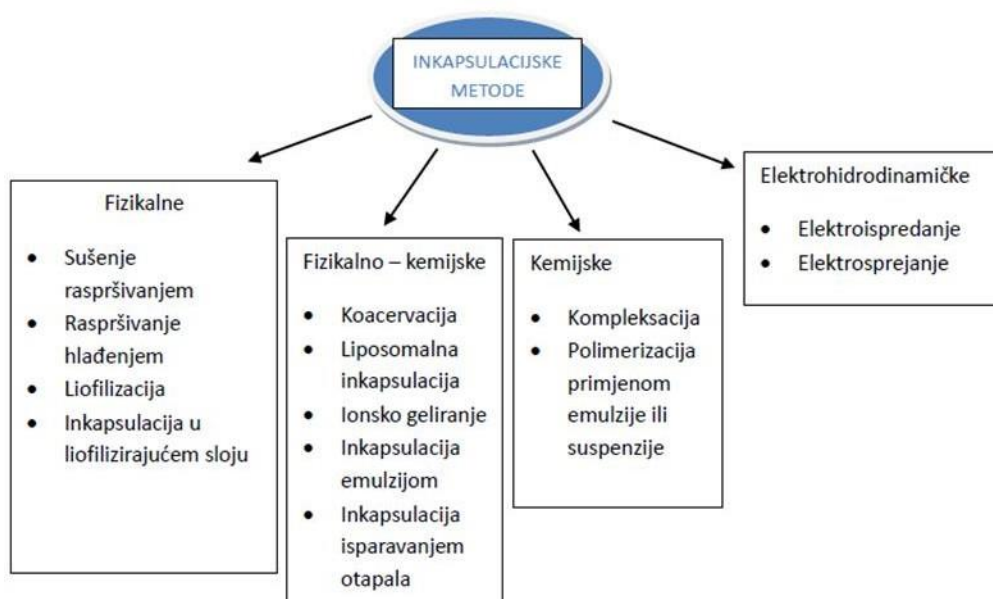
Slika 2. Prikaz strukture ehinakozida i verbaskozida (Stanković, 2020)

2.2. TEHNIKE INKAPSULACIJE

Inkapsulacija podrazumijeva proces u kojem se aktivna tvar „upakirava“ u čvrsti omotač ili film koji tu tvar štiti od različitih uvjeta (temperatura, vlaga). Postoje brojne tehnike inkapsulacije koje su pronašle svoju primjenu u raznim industrijama, za što su primjeri navedeni niže, upravo iz razloga što se tom tehnikom osjetljivi spojevi poput polifenola mogu zaštititi od oksidacije i drugih degradativnih utjecaja (Sonawane i sur., 2020). Primjerice, eterična ulja i uljne smole, koje sadrže neke biljke, štite se od evaporacije i oksidacije inkapsulacijom u suhom obliku. Inkapsulacijom se aktivna stvar štiti i od isparavanja hlapljivog materijala, za maskiranje nepoželjnih svojstava aktivne tvari poput okusa ili mirisa. Na Slici 3. prikazana je podjela metoda inkapsulacija (El-Kader A. i Hashish A., 2019).

2.2.1. Elektroispredanje

Elektroispredanje je tehnika inkapsulacije koja se koristi za proizvodnju vlakana na bazi (bio)polimera pod utjecajem visokog napona, promjera od nekoliko nanometara do mikrometara. Rad koji je otvorio put proizvodnji nanovlakana bio je „Process and apparatus for preparing artificial threads“ auora Antona Formhals 1930-ih godina, a u njemu je opisan proces proizvodnje nanovlakana iz acetilceluloze (Formhals, 1934).



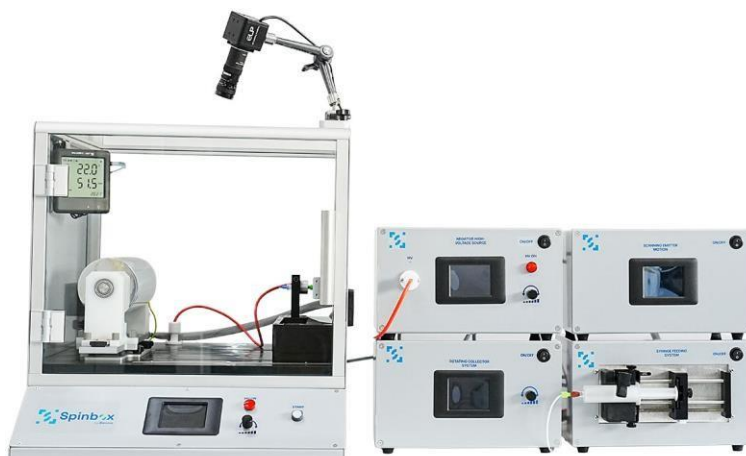
Slika 3. Prikaz podjele inkapsulacijskih metoda (prema El-Kader i Hashish, 2019)

Dosad, elektroispredanje je najviše istraženo na području biomedicine za razvoj biokompatibilnih materijala, farmaceutske industrije u formulaciji inkapsuliranih dozirnih sustava (Zhang i sur., 2023), u proizvodnji senzora (Han i sur., 2023), okolišnom inženjerstvu (Song i sur., 2023) i dr. U prehrambenoj industriji, najčešće se koristi u razvoju ambalažnih materijala, poput aktivne ambalaže antimikrobnih svojstava za produljenje skladištenja namirnica (Yang i sur., 2021), aktivne ambalaže obogaćene bioaktivnim spojevima (Duan i sur., 2021) i sl.

Uobičajenu opremu za elektroispredanje čine: visokonaponsko napajanje (kV), pumpa, uzemljeni kolektor i igla sa stalkom (Slika 4.). Preko plastične cjevčice, šprica je povezana sa iglom odgovarajućeg promjera na čijem se vrhu nalazi spojeni izvor visokog napona (igla je smještena u izoliranom kućištu). Dovodom visokog napona, uspostavlja se električno polje između vrha igle i kolektora. Ukoliko se primijeni dovoljno visok napon, tj. ukoliko se uspostavi dovoljno jaka razlika potencijala između otopine biopolimera i kolektora, prevladava se površinska napetost otopine i dolazi do „rastezanja“ kapljica otopine, tj. formacije polimernog mlaza. Bitna je koncentracija polimerne otopine za uspješan proces elektroispredanja. Naime, viskozne otopine rezultiraju vlaknima s diskontinuiranom strukturom, dok otopine niske viskoznosti često rezultiraju elektrosprejanjem umjesto elektroispredanjem. Suha vlakna sakupljaju se na uzemljenom kolektoru oblikujući netkanu oblogu. Tehnika se provodi na

sobnoj temperaturi, a morfologija nanovlakana varira ovisno o vrsti korištenog polimera i uvjetima ispredanja. U procesu su važni čimbenici 1) fizikalna svojstva otopine (viskoznost, elastičnost, vodljivost i površinska napetost), 2) procesni parametri poput protoka, udaljenosti između igle i kolektora, promjera igle i veličina napona te 3) parametri okoliša (temperatura otopine, vlažnost i temperatura zraka te protok zraka). Napon igra ključnu ulogu u procesu elektroispredanja jer je formiranje vlakna moguće samo kad primijenjeni napon prelazi određeni prag. Kako se primijenjeni napon povećava, elektrostatska sila na otopinu raste, što rezultira smanjenjem promjera vlakana. Molekulska masa polimera također značajno utječe na reološka (viskoznost, površinska napetost) i električna (vodljivost, dielektrična čvrstoća) svojstva, pri čemu promjer vlakana raste s povećanjem molekulske mase i koncentracije polimera (Faldu, 2020). Diep i Schiffman (2021) utvrdili su da se smanjenjem površinske napetosti i konduktivnosti početne otopine alginata smanjuje promjer vlakana, ista su konzistentna, glatka i veća. Navedeno su postigli dodavanjem surfaktanta PS80 u početnu otopinu. Provođenjem elektroispredanja s alginatom i dodavanjem surfaktanta, uspjeli su inkapsulirati $2,74 \times 10^5$ CFU/g *E. coli*. Za otapala se najčešće koriste polarno-protična (voda, etanol, metanol, mravlja kiselina, octena kiselina), polarno-aprotična (dimetilformamid, diklormetan, aceton, tetrahidrofuran) te nepolarna otapala poput kloroforma. Viskoznost, kao važno fizikalno svojstvo otapala, utječe na veći promjer nanovakana (Gomez-Estaca i sur., 2012). Međutim, prevelika viskoznost može ometati formiranje Taylorovog konusa i uzrokovati začepjenja igle ili mlaznice (Pillay i sur., 2013). Tanja vlakna obično se postižu upotrebom otapala s većom dielektričnom konstantom, dok se smanjenjem koncentracije otopine polimernih smjesa mogu dobiti vlakna manjeg promjera. Temperatura okoline također ima utjecaj na reološka svojstva otopine i tlak pare otapala. Iako vanjski faktori poput vlažnosti mogu značajno utjecati na oblik vlakana, često se vrijednosti vlažnosti ne navode u literaturi. Ipak, istraživanja su pokazala da relativna vlažnost može utjecati na strukturu i dimenzije vlakana te da je proces složeniji pri visokoj vlažnosti (Faldu, 2020). Geometrija mlaznice, odnosno dio igle kroz koji polimer teče, također utječe na proizvodnju vlakana različite morfologije.

U elektroispredanju, najčešće se koriste dvije izvedbe: kapilarno elektroispredanje (pomoću igle) i elektroispredanje metodom slobodnih površina (bez kapilare/igle/mlaznice). Kapilarno elektroispredanje (eng. needle electrospinning) se provodi u vodoravnoj ili vertikalnoj postavi, ovisno o relativnom odnosu pozicija pumpe i kolektora (Williams i sur., 2018). Ovisno o željenoj morfologiji, najčešće se koriste pločasti i rotirajući kolektor (Abd Razak i sur., 2015).



Slika 4. Uređaj za elektroispredanje (Spinbox Systems User Guide)

2.2.2. Nosači za inkapsulaciju

Odabir nosača, odnosno materijala za inkapsulaciju aktivne tvari, ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima korištenog nosača te o primijenjenoj inkapsulacijskoj tehnici. Najčešće korišteni nosači za inkapsulaciju, samostalno i/ili u kombinaciji su: i) polisaharidi (arapska guma, pululan, guar guma, alginat, karagenan, pektin, glukomanani, ksantan guma i dr.), proteini (kazein, želatina, proteini sirutke, sojini proteini i dr.) i lipidi (fosfolipidi, glikolipidi i dr. (Heywood, 2018).

Pululan je bijeli prah bez okusa i mirisa, nemutagen i nehigroskopan polimer koji je jestiv. Netopiv je u organskim otapalima, osim u dimetil sulfoksidu i dimetilformamidu. Ima sposobnost formiranja filmova u vodenim otopinama u koncentracijama već od 5-25 %. Dobiva se mikrobnom fermentacijom pomoću *Aureobasidium pullulan* ili *Pullularia pullulans*. Posjeduje α -(1, 4) i α -(1, 6) glikozidne veze u strukturi te je stoga fleksibilan i uspješno se koristi za proizvodnju nanovlakna. Sve češće se koristi kao jestivi premaz i višenamjenski materijal za pakiranje hrane zahvaljujući svojstvima poput otpornosti na ulje, antistatičkoj prirodi te sposobnosti stvaranja barijera za kisik i vodu (Muthusamy i sur., 2022), a u prehrambenoj industriji može se koristiti kao zamjena za škrob u tjestenini ili pekarskim proizvodima (Singh i Saini, 2012). **Zein** je glavni skladišni protein u kukuruzu i sastoji od četiri komponente: alfa, beta, gama i delta. U komercijalnom zeinu najzastupljeniji je alfa zein, koji se sastoji od šest frakcija s molekularnom težinom od 10 - 27 kDa i topiv je u 70-95 %-tnom

etanolu. Beta frakcija je topljiva u 60 %-tnom etanolu, ali netopljiva u 95 %-tnom etanolu, dok je gama frakcija topiva u etanolu samo uz upotrebu redukcijskog sredstva (Hudson, 1997). Komercijalni zein slabo su topljivi u vodi. Među biopolimerima, zein se ističe svojim jedinstvenim hidrofobnim karakterom, čineći ga dobrim alternativnim kandidatom sintetskim polimerima. Iz zeina se mogu stvarati biofilmovi, odnosno vlakna, no ona su često lomljiva. Neke od primjena zeina uključivale su ugrađivanje galne kiseline u zeinska nanovlakna kako bi se očuvala antioksidativna aktivnost galne kiseline (Neo i sur., 2013). Razvijen je i nanobiosenzor od zeinskih filmova presvučenih tankim slojem zlata, koji se koristi za otkrivanje alergenskih proteina u kikirikiju pomoću tehnike površinski pojačane Ramanove spektroskopije (SERS) (Reza Kasaai, 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za provedbu eksperimentalnog dijela rada korišten je nadzemni dio biljke trave ive (*Teucrium montanum L.*) prikupljene u Primorskoj Hrvatskoj (naselje Varivode, Općina Kistanje (Šibensko-kninska županija)). Biljni materijal je očišćen od stranih primjesa, osušen na suhom i prozračnom mjestu, zatim usitnjen u električnom mlinu i prosijan na veličinu čestica manju od 450 µm, te kao takav korišten za pripremu vodenog ekstrakta.

3.1.2. Kemikalije

Priprema binarnih sustava nosača u ekstraktu

- pululan, Biosynth (Bratislava, Slovačka)
- hidrolizirani kolagen, Biosynth (Bratislava, Slovačka)
- zein, Acros Organics Bvba (Geel, Belgija)
- ledena octena kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- suncokretov lecitin, NUTRIMEDICA d.o.o., Hrvatska

Spektrofotometrijske metode

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- bezvodni natrijev karbonat, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- ehinakozid (>98 %), Biosynth, Slovačka
- metanol (100 %, HPLC čistoće), GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- klorovodična kiselina (37 %-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev nitrit, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

- natrijev molibdat, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-PDA):

- mravlja kiselina (100 %, HPLC čistoće), Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)
- acetonitril (100 %, HPLC čistoće), Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- ehinakozid (>98 %), Biosynth, Slovačka
- verbaskozid (>98 %), Biosynth, Slovačka

3.1.3. Aparatura i pribor

- laboratorijski pribor: teflonski magneti, Pasteur pipete, optičke kivete za spektrofotometrijsko mjerenje, plastične šprice (2 mL), mikrofilteri od regenerirane celuloze (veličine pora 0,20 µm), HPLC vialice za uzorke s navojnim čepovima - Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (50 i 15 mL), Eppendorf epruvete (2 mL), Pasteur pipete
- laboratorijsko stakleno posuđe: odmjerne tikvice, reagens boce, menzure, laboratorijske čaše, staklene epruvete, pipete
- automatske mikropipete Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- električni mlinac za usitnjavanje, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)
- vorteks, Dlab Scientific (Schiltigheim, Francuska)
- analitička vaga New Classic ML204/01, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- centrifuga SL 8R, Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- magnetska mješalica SMHS-6, Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- vakuum uparivač IKA RV8 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj S60H Elmasonic, Elma Schmidbauer (Singen, Njemačka)
- spektrofotometar GenesysTM 10S UV-VIS, Thermo Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od degazera, kvarterne pumpe, automatskog injektora, termostata kolone i DAD (eng. Diode-Array Detector) detektora
- HPLC kolona Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 µm, 100 Å), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- uređaj za elektroispredanje Spinbox Systems, Bioinicia (Valencia, Španjolska)
- digitalni termohigrometar Boneco 200X (St. Gallen, Švicarska)

3.2. METODE

3.2.1. Bioaktivna karakterizacija ekstrakta trave ive

3.2.1.1. Priprema vodenog ekstrakta

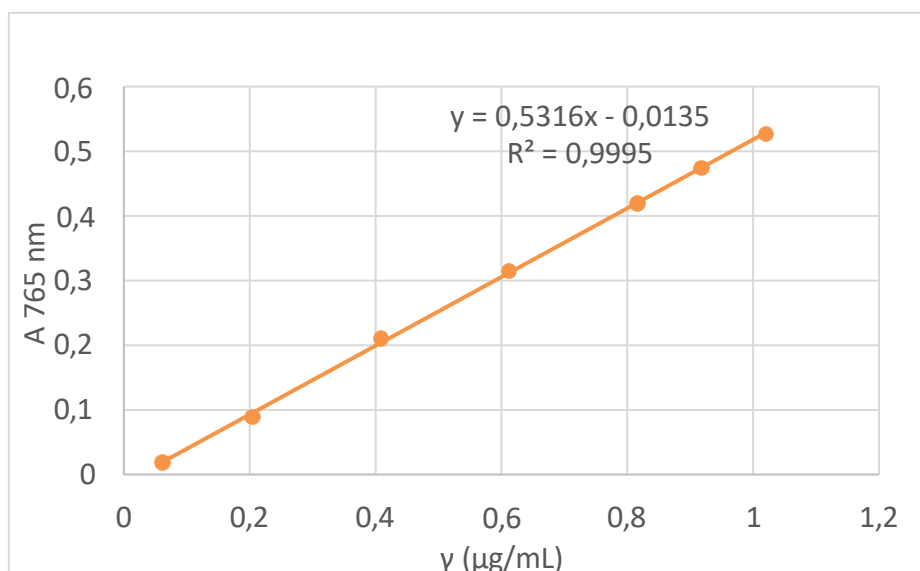
Vodeni ekstrakt trave ive pripremljen je konvencionalnom ekstrakcijom pri 100 °C kroz 30 minuta u vodenoj kupelji. Omjer biljnog materijala i vode u uzorku iznosio je 1 g : 100 mL. Ekstrakt je ohlađen, filtriran kroz papirnati filter i potom uparavan do suhog na rotacijskom vakuum uparivaču (RV8, IKA) pri temperaturi od 40 °C, te je resuspendirana suha tvar ekstrakta u destiliranoj vodi liofilizirana tijekom 24 h (liofilizator Christ, Alpha LSCplus, Njemačka). Tako pripremljeni liofilizat otopljen je u vodi na način da je dobiven 10 puta koncentriraniji polifenolni ekstrakt odnosu na ekstrakt prije uparavanja, te je tako i korišten za pripremu binarnih sustava nosača na bazi pululana i kolagena. U slučaju pripreme otopina pululana i zeina pomoću suncokretovog lecitina, liofilizat trave ive otopljen je na isti način, ali uz korištenje drugog otapala (50 % - tna ledena octena kiselina, v/v).

3.2.1.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC metoda)

Ukupni polifenoli određeni su kolorimetrijskom TPC metodom (*engl.* Total Phenolic Content) temeljenoj na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline) i polifenola u lužnatim uvjetima pri čemu fenolni spojevi reduciraju Folin-Ciocalteu reagens stvarajući tako plavo obojeni reakcijski kompleks. Intenzitet obojenja određuje se spektrofotometrijski mjernjem apsorbancije pri 765 nm (Singleton i sur., 1999), a koja je proporcionalna koncentraciji prisutnih polifenolnih spojeva.

Postupak rada:

Otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razrjeđivanjem s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata. Na isti način pripremi se i slijepa proba, a koja umjesto uzorka sadržava destiliranu vodu. Nakon završetka reakcije (2 h), izmjeri se apsorbancija reakcijske smjese i slijepa probe pri 765 nm, pri čemu se za daljnji izračun uzima razlika vrijednosti apsorbancije reakcijske smjese i slijepa probe. Koncentracija ukupnih polifenola izračuna se uvrštavanjem konačne apsorbancije u jednadžbu baždarnog pravca dobivenog iz baždarne krivulje za ehinakozid u definiranom koncentracijskom rasponu (50 – 1000 µg/mL) prikazane na Slici 5. Određivanje ukupnih polifenola provedeno je u dvije paralele, a rezultati su izraženi u gramima ekvivalenata ehinakozida na 100 mL ekstrakta (g ekv. ehi/100 mL). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja uz pripadajuću standardnu devijaciju.



Slika 5. Baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ehinakozida pri reakcijskim uvjetima TPC metode

3.2.1.3. Metoda određivanja udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Princip metode

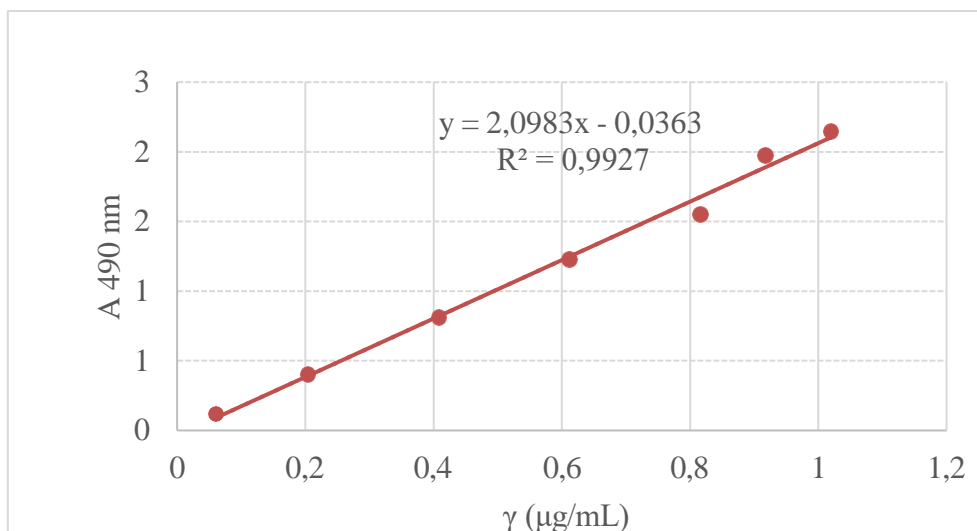
Metoda se temelji na reakciji kiselinske hidrolize i formiranju reakcijskog kompleksa ružičasto-crvenkastog obojenja pri dodatku Arnou-og reagensa u lužnatim uvjetima. Intenzitet obojenja reakcijske smjese određuje se mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalna intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

Postupak rada

U epruveti se pomiješa 500 µL uzorka sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnou-og reagensa, 1 mL 8,5% -tne vodene otopine NaOH i doda se 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se vorteksira, a apsorbancija se očitava pri 490 nm. Za slijepu probu se umjesto 100 µL uzorka otpipetira 100 µL destilirane vode te se mjeri apsorbancija koja se oduzima od apsorbancije uzorka. Udio hidroksicimetnih kiselina izračuna se iz jednadžbe baždarne krivulje za ehinakozid u definiranom koncentracijskom rasponu (25 – 1000 µg/mL) prikazane na Slici 6., a koja prikazuje linearnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja.

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina provedeno je u dvije paralele, a rezultati su izraženi u gramima ekvivalenta ehinakozida na 100 mL ekstrakta (g ekv. ehi/100 mL). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja uz pripadajuću standardnu

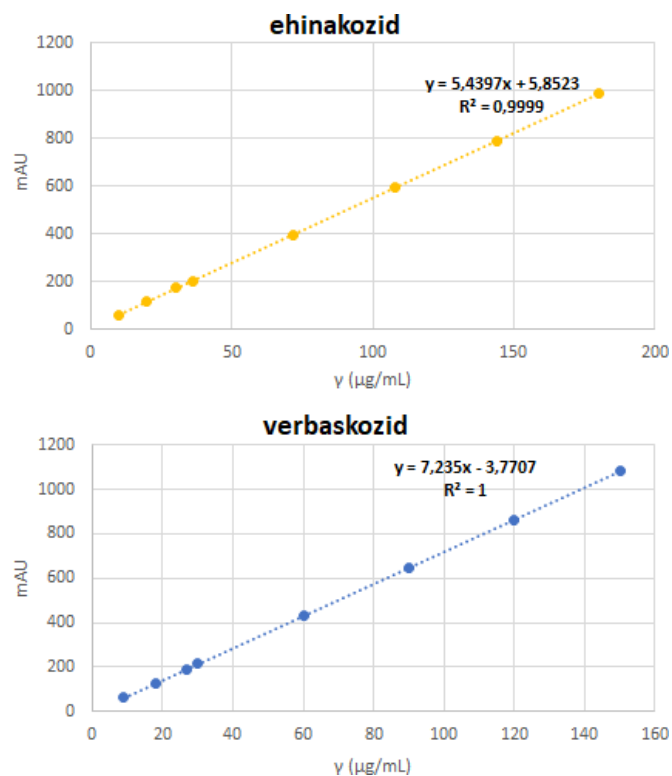
devijaciju.



Slika 6. Baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ehinakozida pri reakcijskim uvjetima metode za određivanje ukupnih HC

3.2.1.4. Kvantifikacija feniletanoidnih glikozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC metoda)

Za kvantifikaciju feniletanoidnih glikozida ehinakozida, verbaskozida, teupoliozida, stahizozida A i poliumozida korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana za detektor s nizom dioda (HPLC-PDA) provedena je korištenjem analitičke kolone Zorbax Extend C-18 (250 × 4,5 mm, 5 mikrona) (Agilent Technologies, SAD). Razdvajanje je postignuto gradijentnom elucijom uz korištenje vodene faze A (1 % mravlje kiseline u vodi, v/v) i organske faze B (1 % mravlje kiseline u acetonitrilu, v/v). Volumen uzorka iznosio je 5 μL , dok je brzina protoka mobilnih faza održavana na 1 mL/min pri temperaturi od 25 °C. Trajanje metode iznosilo je 50 minuta, uz dodatnih 10 minuta ekvilibracije na početne kromatografske uvjete. Nepoznati spojevi identificirani su metodama spektroskopije nuklearne magnetske rezonance i masene spektrometrije visoke razlučivosti (HR MS/MS) prema radu Mandura Jarić i sur. (2023). Kvantifikacija ehinakozida i verbaskozida provedena je pomoću jednadžbe baždarnog pravca za ehinakozid (3–180 $\mu\text{g/mL}$) i verbaskozid (3–90) prikazane na Slici 7., dok su preostali spojevi kvantificirani u ekvivalentima ehinakozida.



Slika 7. Baždarne krivulje ehinakozida i verbaskozida za kvantifikaciju HPLC metodom

3.2.2. Inkapsulacija elektroispredanjem

3.2.2.1. Provedba elektroispredanja

Za proizvodnju nanovlakana korišteni su binarni polimerni sustavi na bazi pululana i kolagena u vodenom ekstraktu, odnosno pululana i zeina u zakiseljenom polifenolnom ekstraktu trave ive uz suncokretov lecitin (3 %, w/w), kako je navedeno u Tablici 2.

Tablica 2. Korišteni binarni sustavi polimera za innkapsulaciju ekstrakta trave ive elektroispredanjem

| Polimerni nosač 1 (%) | Polimerni nosač 2(%) | Udio polimernog nosača 1 | Udio polimernog nosača 2 | Ukupni maseni udio nosača (%) | Oznaka uzorka |
|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------|
| PUL | KOL | 80 | 20 | 12 | PUL:KOL/80:20 |
| PUL | KOL | 60 | 40 | 12 | PUL:KOL/60:40 |

| | | | | | |
|-----|-----|----|----|----|---------------|
| PUL | KOL | 40 | 60 | 12 | PUL:KOL/40:60 |
| PUL | ZE | 80 | 20 | 15 | PUL:ZE/80:20 |
| PUL | ZE | 60 | 40 | 15 | PUL:ZE/60:40 |
| PUL | ZE | 40 | 60 | 15 | PUL:ZE/40:60 |

Pripremljene otopine nosača u ekstraktu trave ive najprije su homogenizirane na magnetnoj miješalici u trajanju od 12h pri sobnoj temperaturi. Korišten je uređaj za elektroispredanje s uzemljenim kućištem, peristaltičkom pumpom, stalkom za metalnu glavu s plastičnom iglom (22 G) te pločastim kolektorom. Dovod polimerne otopine od pumpe do igle omogućen je plastičnom cjevčicom. Parametri procesa elektroispredanja za otopine nosača u ekstraktu definirani su prema Tablici 3.

Tablica 3. Procesni parametri elektroispredanja otopina nosača u polifenolnom ekstraktu trave ive

| Polimerni sustavi | Protok otopine (mL/h) | Napon (kV) | d _{igla - kolektor} (cm) |
|-------------------|-----------------------|------------|-----------------------------------|
| PUL:KOL | 0,8 | 19-21 | 13 |
| PUL:ZEIN | 0,8 | 19-24 kV | 12 - 15 |

Proces se provodio pri temperaturi od 25 ± 2 °C i relativnoj vlažnosti od 32 ± 1 %, koja je mjerena digitalnim termohigrometrom Boneco 200X. U prisutnosti visokog napona, formirao se tzv. Taylorov konus na vrhu igle, i posljedično, elongirani i stabilni mlaz polimerne otopine. Uz istovremeno isparavanje otapala, formirala su se nanovlakna, sakupljena na pločastom kolektoru prekrivenom aluminijskom folijom. Svi uzroci nanovlakana dodatno su liofilizirani te su pohranjeni u eksikatoru na sobnoj temperaturi do daljnjih analiza.

3.2.2.2. Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti polifenolnih spojeva u nanovlaknima
 Inkapsulacijska učinkovitost pripremljenih vlakana određena je mjerenjem ukupnog udjela polifenola TPC metodom opisanom u potpoglavlju 3.2.1.2. te analizom pojedinačnih feniletanoidnih glikozida HPLC-PDA metodom opisanom u potpoglavlju 3.2.1.4.

Sve otopine nosača u ekstraktu za elektroispredanje i dobiveni uzorci nanovlakana najprije su precipitirani 96 %-tnim etanolom u svrhu uklanjanja prisutnih polimera. Otpipetirano je 300 µL razrijeđene otopine nosača / prethodno otopljenog inkapsulata i 300 µL 96 %-tnog EtOH za uzorke na bazi pululana i kolagena, odnosno 70 %-tnog EtOH za uzorke na bazi pululana i

zeina. Nakon centrifugiranja (7000 rpm, 15 min), dio supernatanta korišten je za TPC analizu, a dio uzorka je profiltriran (RC Chromafil filteri, 0,20 μm) u vijalice za HPLC analizu. Inkapsulacijska učinkovitost, izražena kao omjer udjela polifenolnih spojeva prilikom ulaska u proces i koncentracije polifenolnih spojeva u inkapsulatu, izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$IU (\%) = W_i / W_u \times 100 \quad [1]$$

pri čemu je W_i udio polifenolnih spojeva na suhu tvar liofiliziranih nanovlakana (računata kao 100 %), dok je W_u udio polifenolnih spojeva na suhu tvar polimerne otopine.

3.2.2.3. Morfološka karakterizacija nanovlakana

Za analizu uspješnosti formiranja nanovlakana elektroispredanjem iz odabranih binarnih sustava polimera te za određivanje relativne distribucije nanovlakana, korištena je pretražna elektronska mikroskopija (*eng.* scanning electron microscopy). Ova tehnika omogućava dobivanje realne dvodimenzionalne slike uzoraka s visokom razlučivošću. Osnovni princip rada temelji se na proizvodnji snopa visokoenergetskih elektrona iz volframove niti. Ti elektroni prolaze kroz elektromagnetske leće koje precizno usmjeravaju elektrone prema promatranom uzorku, pri čemu se generira slika na temelju prozvedenih električnih signala. Uzorci su najprije nanoseni na specijalizirane nosače, a prethodno su impregnirani slojem zlata u cilju osiguranja električne provodljivosti. Mikroskopsko skeniranje je provedeno pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (TESCAN CAN Mira3) pri naponu od 10 kV, a slike su snimane pri povećanjima od 5000 – 10000 \times .

Relativna distribucija promjera nanovlakana određena je analizom dobivenih pretraženih elektronskih mikrografija pomoću ImageJ softvera za obradu slika (Nacionalni Institut za zdravlje i Laboratorij za optičku i računsku instrumentaciju Sveučilišta u Wisconsinu, SAD). Obrađeno je 60 nanovlakana unutar svakog uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je inkapsulirati polifenolni ekstrakt trave ive elektroispredanjem uz korištenje dva binarna sustava nosača (PUL:KOL i PUL:ZE) te odrediti prikladnost polimernih kombinacija za dobivanje inkapsuliranih doziranih sustava u obliku nanovlakana određivanjem inkapsulacijske učinkovitosti i morfoloških karakteristika.

4.1. BIOAKTIVNA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA TRAVE IVE

Za karakterizaciju bioaktivnih spojeva trave ive korištene su spektrofotometrijske metode određivanje udjela ukupnih polifenola i udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Za karakterizaciju pojedinih feniletanoidnih glikozida korištena je HPLC metoda. U Tablici 4.

prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 4. Bioaktivna karakterizacija vodenog ekstrakta trave ive

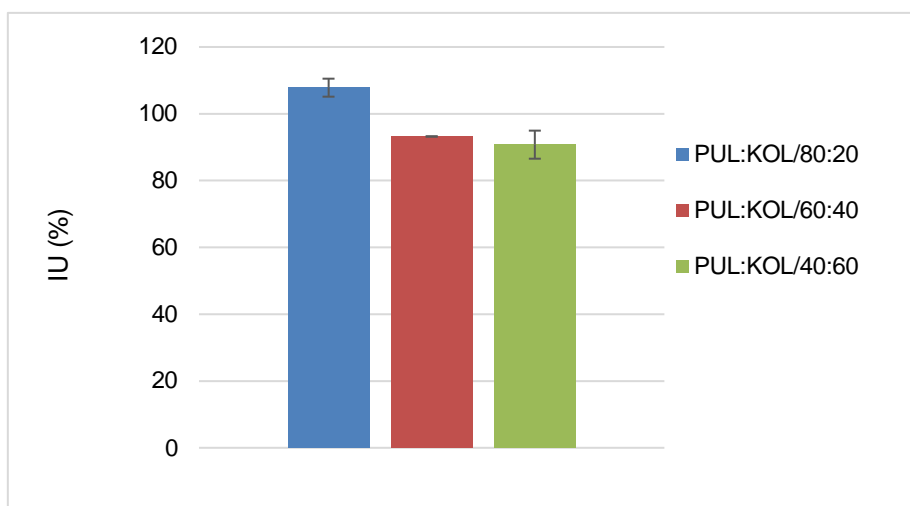
| TPC | HC | ehinakozid | teupoliozid | stahiozid A | poliumozid | verbaskozid |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| g/100 mL | | | | | | |
| 0,730±0,009 | 0,690±0,004 | 0,152±0,018 | 0,041±0,007 | 0,085±0,013 | 0,057±0,008 | 0,039±0,006 |

TPC- ukupni polifenoli, HC - ukupne hidroksicimetne kiseline

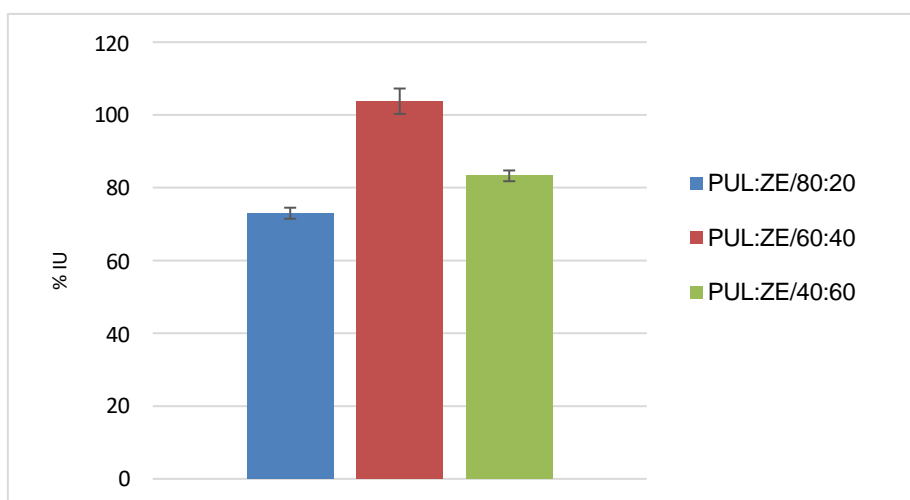
Prema rezultatima iz Tablice 4. može se zaključiti da otprilike 20 % udjela ukupnih polifenola trave ive čini ehinakozid, dok su teupoliozid, stahiozid, poliumozid i verbaskozid određeni u manjem udjelu. Dakle, ehinakozid je dominantni feniletanoidni glikozid u travi ivi koji se nalazi još u 2 vrste roda *Teucrium*, dok je verbaskozid zastupljen čak u 12 vrsta roda *Teucrium* (Stanković, 2020). Slične rezultate za udjel ehinakozida i verbaskozida u *C. salsa* dobili su Kartbaeva i sur. (2017), odnosno poliumozida u *C. sinensis* (Lu i sur., 2013).

4.2. BIOAKTIVNA KARAKTERIZACIJA NANOVLAKANA

Inkapsulacijska učinkovitost predstavlja važan parametar pri određivanju potencijala polimernih nosača u zadržavanju polifenolnih spojeva. Prema dobivenim rezultatima (Slika 8. i 9.), vidljivo je da se najbolja inkapsulacijska učinkovitost postigla kod sustava polimera PUL:KOL/80:20 (107,82 %) i kod polimera PUL:ZE/60:40 (103,77 %). Kod ostalih polimernih otopina također je postignuta dobra inkapsulacijska učinkovitost koja je bila iznad 80 %.

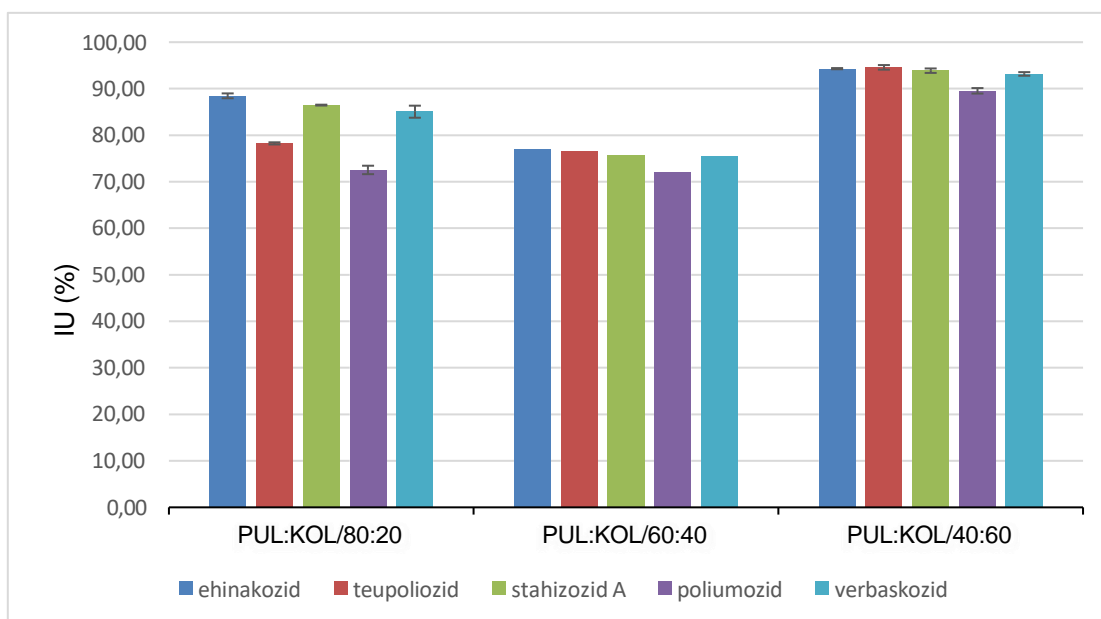


Slika 8. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola u nanovlaknima na bazi PUL:KOL

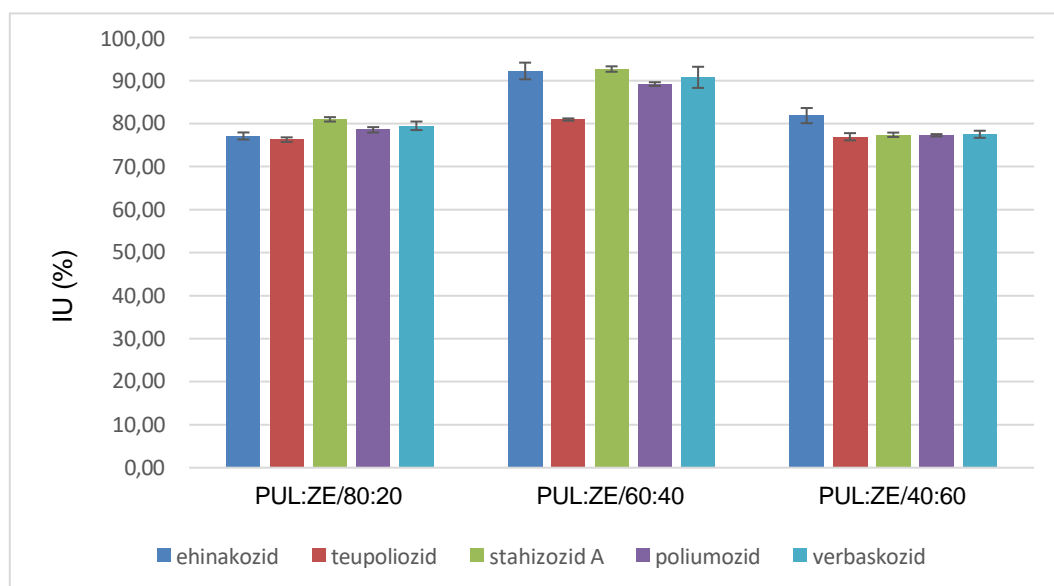


Slika 9. Inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola u nanovlaknima na bazi PUL:ZE

Usporedbom rezultata inkapsulacijske učinkovitosti pojedinačnih feniletanoidnih glikozida (Slike 10. i 11.), primjećuje se da je ehinakozid inkapsuliran u svim polimernim sustavima u najvećem udjelu (77,04-94,30 %), a vrlo dobru uspješnost inkapsulacije ima i stahizozid A (75,64-93,87 %). Što se tiče sastava polimera, u ovom radu učinkovitiji su se pokazali sustavi PUL:KOL/40:60 gdje je inkapsulacijska učinkovitost između 89,54 i 94,59 %, te PUL:ZE/60:40 gdje se učinkovitost kretala između 80,94 i 92,68 %.



Slika 10. Inkapsulacijska učinkovitost pojedinačnih feniletanoidnih glikozida u nanovlaknima na bazi PUL:KOL



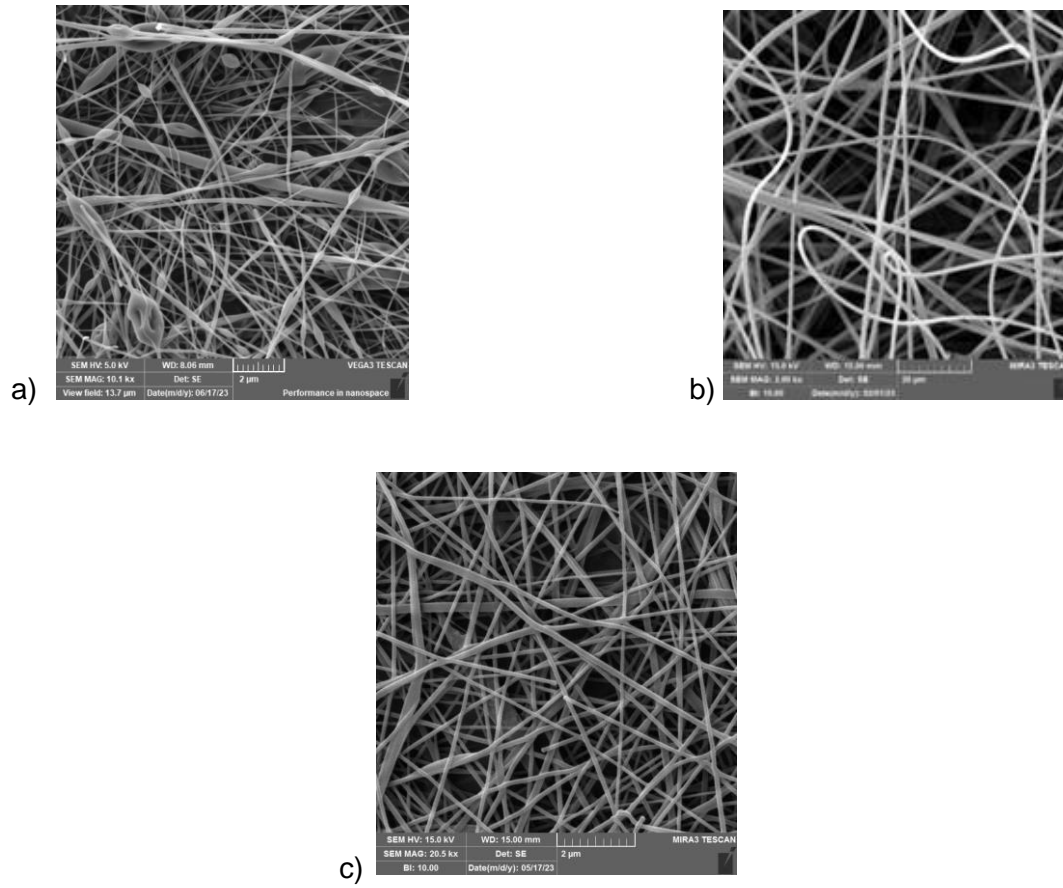
Slika 11. Inkapsulacijska učinkovitost pojedinačnih feniletanoidnih glikozida u nanovlaknima na bazi PUL:ZE

Nishimoto-Sauceda i sur. (2022) dokazali su u svojem istraživanju da se inkapsulacijom

molekula α -tokoferola i rezveratrola uz zein kao nosač poboljšava njihova bioraspoloživost. Tako su nanovlakna zeina zadržala oko 47 % α -tokoferola i 80 % rezveratrola nakon 84 dana skladištenja, odnosno antioksidacijska aktivnost ovih spojeva u inkapsuliranom obliku povećala se za 17 % u usporedbi sa slobodnim komponentama. Istraživanje je pokazalo da zeinom inkapsuliran resveratrol ima bolju bioraspoloživost kada se uzima oralno, produžujući poluvrijeme raspada s 1–3 sata na 9 sati. Slična poboljšanja odredili su Dai i sur. (2017) za kvercetin inkapsuliran u nanočestice zeina. Inkapsulacijom kurkumina uz nosače zein i lecitin, stabilnost kurkumina povećala se za 70 % pri toplinskoj obradi i za 20 % pri izlaganju UV zračenju u odnosu na slobodni kurkumin. Zhang i sur. (2019) dokazali su da polimer zein-kazeinat-alginat, korišten za inkapsulaciju propolisa, poboljšava kemijsku stabilnost fenolnih spojeva u propolisu štiteći ih od razgradnje uzrokovane promjenama pH, te povećava bioraspoloživost propolisa za 50% u odnosu na slobodni propolis. Navedeni rezultati navode na zaključak da zein kao nosač ima dobar potencijal za inkapsulaciju bioaktivnih tvari u kombinaciji s drugim polimerom, u ovom slučaju s pululanom. Wen i sur. (2017) inkapsulirali su nizin unutar amarant/pululanskih nanovlakana, postigavši visoku učinkovitost inkapsulacije od 95 %. Također su uspješno inkapsulirali folnu kiselinu u navedenu smjesu polimera s učinkovitošću većom od 95 %, što ukazuje da je pululan dobar nosač za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva u kombinaciji s nekim proteinima te je u ovom radu korišten s kolagenom i zeinom.

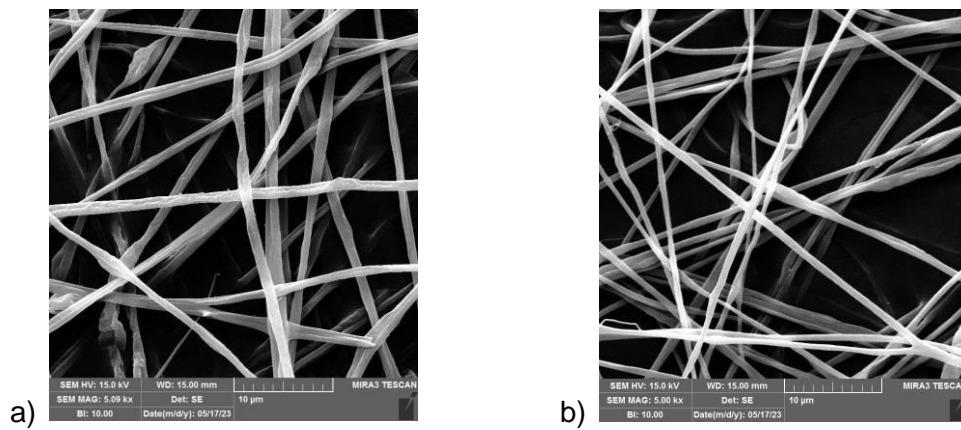
4.3. MORFOLOŠKA ANALIZA NANOVLAKANA

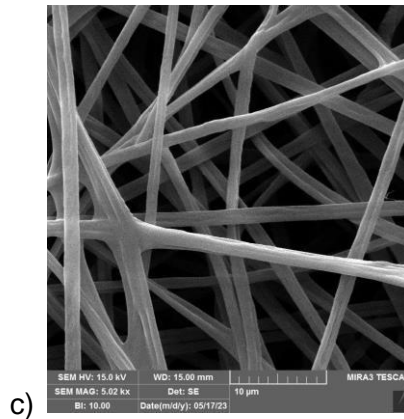
Vizualizacija uspješnosti elektroispredanja omogućena je primjenom pretražne elektronske mikroskopije. Prema Slikama 12. i 13., vidljivo je da su sve binarne otopine nosača u ekstraktu trave ive na bazi pululana i zeina rezultirale strukturom nanovlakana, dok je među tri ispitivane kombinacije na bazi pululana i hidroliziranog kolagena jedna (PUL:KOL/40:60) rezultirala značajno narušenom morfologijom, odnosno pojavom mikročestica i nanovlakana neujednače-ne strukture te zbog toga nije analizirana na relativnu distribuciju i prosječni promjer nanovlakana. Nadalje, vidljiva je i razlika u morfologiji nanovlakana ekstrakta trave ive ovisno o binarnim sustavima nosača.



Slika 12. Mikrografije nanovlakana ekstrakta trave ive na bazi pululana i kolagena:

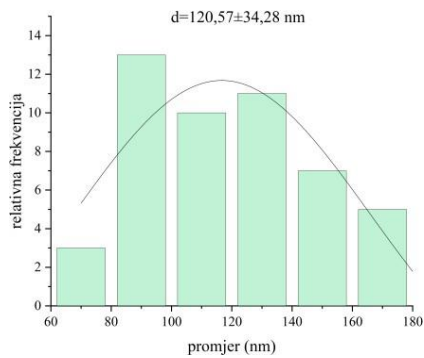
a) PUL:KOL/40:60, b) PUL:KOL/60:40, c) PUL:KOL/80:20



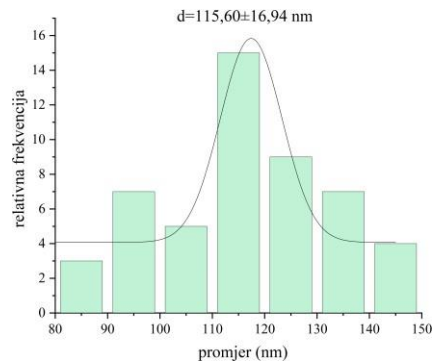


Slika 13. Mikrografije nanovlakana ekstrakta trave ive na bazi pululana i zeina:
 a) PUL:ZE/40:60, b) PUL:ZE/60:40, c) PUL:ZE/80:20

Uočava se razlika u morfoligiji vlakana ekstrakta trave ive na bazi pululana i zeina, u odnosu na pululan i kolagen. Vlakna s kolagenom su gušće sabijena, u odnosu na zeinska vlakna koja su homogene strukture. Kod nanovlakana PUL:KOL/40:60 primjećuje se zrnata struktura i nekontinuirana vlakna koja su porozna. Kod zeinskih vlakana ne dolazi do pojave zrnaca, koja su posljedica prelaska iz elektroispredanja u elektrosprejanje, već su vlakna ravne strukture i kontinuirana bez pora. Qian i sur. (2013) testirali su utjecaj parametara elektroispredanja na morfoligiju nanovlakana koristeći različite koncentracije pululana (12, 15, 20, 25, 30 %) te su utvrdili da se kontinuiranost vlakna uspostavila kod koncentracija pululana između 15 i 30 %, dok se promjer nanovlakana povećavao povećanjem koncentracije pululana. Na Slici 14. i 15. prikazana je relativna distribucija nanovlakana ekstrakta trave ive i vidi se da su u ovom istraživanju najveći promjer imala nanovlakna na bazi pululana i zeina, neovisno o omjeru. Uočava se da su vlakna najmanje kvalitete, odnosno poroznija vlakna, proizvedena primjenom sustava PUL:KOL/40:60, dok se povećanjem koncentracije pululana dobivaju homogenija vlakna, što je posebice vidljivo kod uzorka s nosačem PUL:KOL/80:20. Promjer nanovlakana na bazi PUL:KOL/60:40 u prosjeku je iznosio oko 120 nm, a kod PUL:KOL/80:20 oko 115 nm. Promjer nanovlakana na bazi pululana i zeina kretao se u rasponu od oko 130 nm (PUL:ZE/40:60) do oko 180 nm (PUL:ZE/80:20), odnosno promjer raste sa povećanjem udjela pululana. Drosou i sur. (2018) dobili su slične rezultate ispitujući utjecaj uvjeta procesa na morfoligiju vlakana, koristeći nosače pululan i protein sirutke. Kako su ispitivane polimerne otopine bile zasićenije pululanom, tako je promjer nanovlakana rastao. Također su utvrdili da je termička stabilnost nanovlakna na bazi pululana i proteina sirutke bolja u odnosu na vlakna od čistih proteina sirutke.

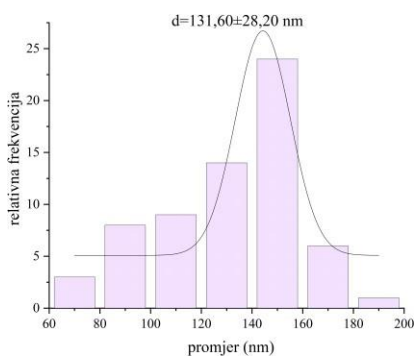


a)

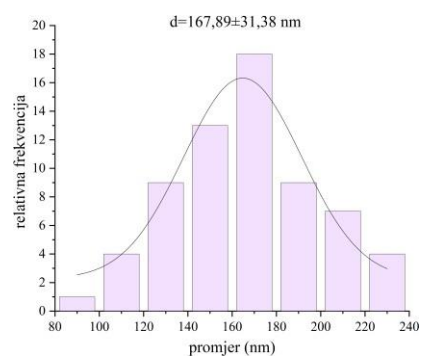


b)

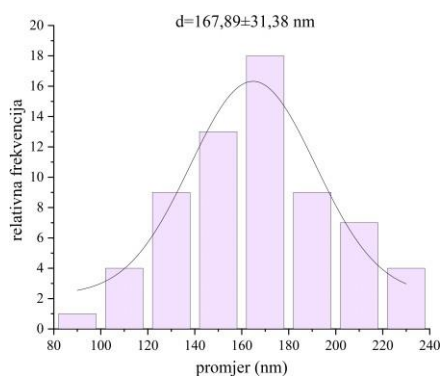
Slika 14. Relativna distribucija nanovlakana na bazi pululana i kolagena: a) PUL:KOL/80:20 i b) PUL:KOL/60:40



a)



b)



c)

Slika 15. Relativna distribucija nanovlakana na bazi pululana i zeina: a) PUL:ZE/80:20, b) PUL:ZE/60:40 i c) PUL:ZE/40:60

5. ZAKLJUČCI

1) U vodenom ekstraktu trave ive određeno je pet feniletanoidnih glikozida s ehinakozidom kao dominantnim sastojkom (20 % udjela ukupnih polifenola).

2) Polifenolni spojevi ekstrakta trave ive uspješno su inkapsulirani elektroispredanjem u formi nanovlakana korištenjem binarnih sustava nosača pululana i zeina te pululana i kolagena, pri čemu je postignuta visoka inkapsulacijska učinkovitost svih ispitivanih feniletanoidnih glikozida u nanovlaknima na bazi PUL:KOL (IU: 72,07 – 94,59 %) i PUL:ZE (76,27 – 92,68 %) sustava nosača.

3) Nanovlakna ekstrakta trave ive na bazi pululana i zeina homogene su strukture, dok su nanovlakna na bazi pululana i kolagena sabijene strukture, a nanovlakna na bazi binarnog sustava PUL:KOL/40:60 rezultirala su narušenom morfologijom i pojavom mikročestica.

4) Povećanje udjela zeina u odnosu na pululan, rezultiralo je i povećanjem prosječnog promjera nanovlakana na bazi PUL:ZE sustava, dok taj trend nije uočen prilikom povećanja udjela hidroliziranog kolagena u odnosu na pululan.

6. POPIS LITERATURE

- Abd El-Kader A, Abu HH (2019) Encapsulation techniques of food bioproduct. *Egypt J Chem* **63**, 1881 - 1909. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.16269.1993>
- Abd Razak SI, Wahab IF, Fadil F, Dahli FN, Md Khudzari AZ, Adeli H (2015) A Review of Electrospun Conductive Polyaniline Based Nanofiber Composites and Blends: Processing Features, Applications, and Future Directions. *Adv Mater* **2015**, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2015/356286>
- Bektašević M, Jurin M, Roje M, Politeo O (2023) Phytochemical Profile, Antioxidant activity and cholinesterase inhibition potential of essential oil and extracts of *Teucrium montanum* from Bosnia and Herzegovina. *Separations* **10**, 421.
- Dai L, Sun C, Li R, Mao L, Liu F i Gao Y (2017) Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein–lecithin composite nanoparticles fabricated by anti-solvent co-precipitation. *Food Chem* **237**, 1163–1171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.134>
- Diep E, Schiffman JD (2021) Encapsulating bacteria in alginate-based electrospun nanofibers. *Biomater Sci* **9**, 4364–4373. <https://doi.org/10.1039/D0BM02205E>
- Drosou C, Krokida M, Biliaderis CG (2018) Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties. *Food Hydrocoll* **77**, 726–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.014>
- Duan M, Yu S, Sun J, Jiang H, Zhao J, Tong C i sur. (2021) Development and characterization of electrospun nanofibers based on pullulan/chitin nanofibers containing curcumin and anthocyanins for active-intelligent food packaging. *Int J Biol Macromol* **187**, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.140>
- Faldu N (2020) Electrospinning of PEO Nanofibers. University of Windsor, Windsor, Ontario, Canada.
- Formhals A (1934) Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. United States Patent Office No. 1975504.
- Gomez-Estaca J, Balaguer MP, Gavara R, Hernandez-Munoz P (2012) Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocoll* **28**, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.11.013>
- Han X, Fan M, Yue X, Zhao X, Liu Y, Hong J i sur. (2023) Linear flexible capacitive sensor with double helix structure based on multi-needle water-bath electrospinning technology. *SMS* **32**, 035012. <https://doi.org/10.1088/1361-665X/acb40d>

- Harbourne JB, Tomás-Barberán FA, Williams CA, Gil MI (1986) A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry* **25**, 2811–2816.
- Heywood JB (2018) *Internal combustion engine fundamentals*, 2. izd., McGraw-Hill Education, New York.
- Hudson SM (1997) *The Spinning of Silk-like Proteins Into Fibers*. U: McGrath K, Kaplan D (ured.) *Protein-Based Materials*, Boston, str. 313–337.
- Kalođera Z, Jurišić R, Pejak K (1996) *Teucrium* vrste - morfologija, rasprostranjenost i uporaba. *Farmaceutski glasnik* **52**, 273–280.
- Kartbaeva EB, Donald GR, Sakipova ZB, Ibragimova LN, Bekbolatova EN, Ternynko II i sur. (2017) Antinociceptive activity of *Cistanche salsa* stolons, growing in the Republic of Kazakhstan. *Rev Bras* **27**, 587–591. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.013>
- Kasaai MR (2018) Zein and zein-based nano-materials for food and nutrition applications: A review. *Trends Food Sci* **79**, 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.015>
- Li F, Shen J, Yang X, Yang Z, Kou J (2015) Enhancement of absorption and bioavailability of echinacoside by verapamil or clove oil. *Drug Des Devel Ther* **9**, 4685–4693.
- Li Y, Zhou G, Peng Y, Tu P, Li X (2016) Screening and identification of three typical phenylethanoid glycosides metabolites from *Cistanches Herba* by human intestinal bacteria using UPLC/Q-TOF-MS. *JPBA* **118**, 167. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.038>
- Li M, Xu T, Zhou F, Wang M, Song H, Xiao X i sur. (2018) Neuroprotective Effects of Four Phenylethanoid Glycosides on H₂O₂-Induced Apoptosis on PC12 Cells via the Nrf2/ARE Pathway. *Int J Mol Sci* **19**, 1135. <https://doi.org/10.3390/ijms19041135>
- Liu Y, He W, Mo L, Shi M, Zhu Y, Pan S i sur. (2013) Antimicrobial, anti-inflammatory activities and toxicology of phenylethanoid glycosides from *Monochasma savatieri* Franch. ex Maxim. *J Ethnopharmacol* **149**, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.042>
- Lu D, Zhang J, Yang Z, Liu H, Li S, Wu B i sur. (2013) Quantitative analysis of *Cistanches Herba* using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods. *J Sep Sci* **36**, 1945–1952. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300135>
- Łuczaj Ł, Jug MD, Dolina K, Jeričević M, Vitasović IK (2021). Insular Pharmacopoeias: Ethnobotanical Characteristics of Medicinal Plants Used on the Adriatic Islands. *Front pharmacol* **12**, 623070. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.623070>
- Mandura Jarić A, Čikoš A, Pocrnić M, Aladić K, Jokić S, Šeremet D, Vojvodić Cebin A, Komes D (2023) *Teucrium montanum* L.—Unrecognized Source of Phenylethanoid Glycosides: Green Extraction Approach and Elucidation of Phenolic Compounds via NMR and UHPLC-HR MS/MS. *Antioxidants* **12**, 1903. <https://doi.org/10.3390/antiox12111903>

- Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J Med Plant Res* **11**, 321–330. <https://doi.org/10.2147/IJN.S298606>
- Menković nN, Šavikin K, Tasić S, Zdunić G, Stešević D, Milosavljević S i sur. (2011) Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains Montenegro. *J Ethnopharmacol* **133**, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.008>
- Mitreski I, Stanoeva JP, Stefova M, Stefkov G, Kulevanova S (2014) Polyphenols in Representative Teucrium Species in the Flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MS Profile and Content. *Nat Prod Commun* **9**, 175-180. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900211>
- Morikawa T, Ninomiya K, Imamura M, Akaki J, Fujikura S, Pan Y i sur. (2014) Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glu-cose tolerance in mice. *J Nat Med* **68**, 561–566. <https://doi.org/10.1007/s11418-014-0837-9>
- Munin A, Edwards FL (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **3**, 793–829. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- Muthusamy S, Swetha Anandharaj J, Ponnusamy Senthil K, Yogesan M, Dai-Viet NV, Vinoth Vaidyanathan K i sur. (2022) Microbial pullulan for food, biomedicine, cosmetic, and water treatment: a review. *Environ Chem Lett* **20**, 3199–3234. <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01460-7>
- Neo YP, Ray S, Jin J, Gizdavic-Nikolaidis M, Nieuwoudt MK, Liu D i sur. (2013) Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physico-chemical study based on zein–gallic acid system. *Food Chem* **136**, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.010>
- Nishimoto DS, Romero LER, Antunes M (2022) Biopolymer nanoparticles: a strategy to enhance stability, bioavailability, and biological effects of phenolic compounds as functional ingredients. *J Sci Food Agric* **102**, 41–52. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11512>
- Padmore JM (1990a) Animal feed - AOAC official method 930.15 - Moisture in animal feed. U: Official Methods of Analysis, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 69-70.
- Pillay V, Dott C, Choonara YE, Tyagi C, Tomar L, Kumar P i sur. (2013) A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *J Nanomater* **2013**, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/789289>
- Kasaai Reza M (2018) Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. *Trends Food Sci.* **79**, 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.015>

- Qian YF, Zheng LJ, Song RY, Du B (2013) Electrospinning of Pullulan Nanofibers for Food Package Materials. *Adv Mater Res* **821–822**, 1321–1325. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.821-822.1321>
- Oyourou JN, Combrinck S, Regnier T, Marston A. (2013) Purification, stability and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts. *Ind Crops Prod* **43**, 820-826.
- Sailović P, Odžaković B, Bodroža D, Vulić J, Čanadanović-Brunet J, Zvezdanović J i sur. (2024) Polyphenolic composition and antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and antihyperglycemic activity of different extracts of *Teucrium montanum* from Ozren Mountain. *Antibiotics* **13**, 358. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040358>
- Savić J, Mačukanović-Jocić M, Jarić S (2019) Medical ethnobotany on the Javor Mountain (Bosnia and Herzegovina). *Eur J Intern Med* **27**, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.eurjim.2019.02.007>
- Singh RS, Saini GK (2012) Biosynthesis of Pullulan and Its Applications in Food and Pharmaceutical Industry, U: Satyanarayana T, Johri BN, Anil Prakash (ured.), *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, Springer Netherlands, Dordrecht, str. 509–553.
- Sonawane SH, Bhanvase BA, Sivakumar M, Potdar SB (2020) Current overview of encapsulation, U: *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System*. Elsevier, Waltham, str. 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819363-1.00001-6>
- Song J, Lin X, Ee LY, Li SFY, Huang M (2023) A Review on Electrospinning as Versatile Supports for Diverse Nanofibers and Their Applications in Environmental Sensing. *Adv Fiber Mater* **5**, 429–460. <https://doi.org/10.1007/s42765-022-00237-5>
- Song X, He J, Xu H, Hu XP, Wu XL, Wu HQ i sur. (2016) The antiviral effects of acteoside and the underlying IFN- γ -inducing action. *Food & Function* **7**, 3017–3030. <https://doi.org/10.1039/C6FO00335D>
- Stanković M. (2020) *Teucrium Species: Biology and Applications*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-52159-2>
- Stanković M, Ćurčić M, Žižić J, Topuzović M, Solujić S, Marković S. (2011a) *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int J Mol Sci* **12**, 4190–4205. <https://doi.org/10.3390/ijms12074190>
- Stanković M, Stefanović O, Čomić L, Topuzović M, Radojević I, Solujić S (2012b) Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Open Life Sci* **7**, 664–671. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0048-x>

- Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J (2011) Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol* **133**, 1051–1076. [10.1016/j.jep.2010.11.033](https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.033)
- Šarić-Kundalić B, Fritz E, Dobeš C, Saukel J (2010) Traditional medicine in the pristine village of Prokoško lake on Vranica Mountain, Bosnia and Herzegovina. *Sci Pharm* **78**, 275-290. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1003-06>
- Šeremet D, Žižek K, Žepić I, Kovačević M, Nodilo LN, Vrsaljko D i sur. (2024) Effect of guar gum-based carriers on the physical and bioactive properties of spray-dried delivery systems of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). *Food Hydrocoll* **150**, 109658. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109658>
- Tumbas V, Mandić A, Četković G, Đilas S, Čanadanović-Brunet J (2004) HPLC analysis of phenolic acids in mountain germander (*Teucrium montanum* L.) extracts. *Acta Period Technol* **35**, 265–273. [10.2298/APT0435265T](https://doi.org/10.2298/APT0435265T)
- Tutin TG (2010) *Flora Europaea*. vol. 3: Diapensiaceae to Myoporaceae, 1. izd, Cambridge University Press, Cambridge.
- Vertuani S, Beghelli E, Scalambra E, Malisardi G, Copetti S, Dal Toso, R, Baldisserotto A, Manfredini S (2011) Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules* **16**, 7068-7080. [10.3390/molecules16087068](https://doi.org/10.3390/molecules16087068)
- Wen P, Wen Y, Zong MH, Linhardt RJ, Wu H (2017) Encapsulation of Bioactive Compound in Electrospun Fibers and Its Potential Application. *J Agric Food Chem* **65**, 9161–9179. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02956>
- Williams GR, Raimi-Abraham BT, Luo CJ (2018a) *Electrospinning fundamentals*, U: Williams GR, Raimi-Abraham BT, Luo CJ (ured.) *Nanofibres in Drug Delivery*, UCL Press, London, str. 24-59.
- Wu A, Yang Z, Huang Y, Yuan H, Lin C, Wang T i sur. (2020) Natural phenylethanoid glycosides isolated from *Callicarpa kwangtungensis* suppressed lipopolysaccharide-mediated inflammatory response via activating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in RAW 264.7 macrophages cell. *J Ethnopharmacol* **258**, 112857. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112857>
- Wu L, Georgiev MI, Cao H, Nahar L, El-Seedi HR, Sarker SD i sur. (2020) Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Med Res Rev* **40**, 2605–2649. [10.1002/med.21717](https://doi.org/10.1002/med.21717)
- Yang Y, Shi Y, Cao X, Liu Q, Wang H, Kong B (2021) Preparation and functional properties of poly(vinyl alcohol)/ethyl cellulose/tea polyphenol electrospun nanofibrous films for active packaging material. *Food Control* **130**, 108331. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108331>

- Zhang C, Gao X, Ren X, Xu T, Peng Q, Zhang Y i sur. (2023) Bacteria-Induced Colloidal Encapsulation for Probiotic Oral Delivery. *ACS Nano* **17**, 6886–6898. [10.1021/acsnano.3c00600](https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00600)
- Zhang F, Khan MA., Cheng H i Liang L (2019) Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: impact on antioxidant activity and stability. *J Food Eng* **247**, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.11.021>
- Zhang Yuanyuan, Cai P, Cheng G, Zhang Yongqiang (2022) A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Nat Prod Commun* **17**, 1–14. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>

Izjava o izvornosti

Ja Tea Vuksan izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tea Vuksan
Vlastoručni potpis