

# Utjecaj dodatka ekstrakta ružmarina i koprive na bioaktivna i senzorska svojstva čokolade

---

Kolonić, Lana

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:159:662354>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Lana Kolonić  
0058218448**

**UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA RUŽMARINA I KOPRIVE NA BIOAKTIVNA I  
SENZORSKA SVOJSTVA ČOKOLADE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

**Mentor:** prof. dr. sc. Draženka Komes

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Utjecaj dodatka ekstrakta ružmarina i koprive na bioaktivna i senzorska svojstva  
čokolade**  
Lana Kolonić, 0058218448

### **Sažetak:**

U posljednje vrijeme na svjetskom tržištu uočava se povećani interes za prehrambenim proizvodima s dodanom vrijednosti. Razvoj takvih proizvoda izazovan je za znanstvenu zajednicu i za industriju jer se nastoje pronaći sastojci s pozitivnim zdravstvenim učincima, a ujedno i prihvatljivih senzorskih svojstava. Cilj ovog rada bio je analizirati polifenolni sastav 2 uzorka ružmarina i 2 uzorka koprive podrijetlom iz Hrvatske i Kine te ekstrakte istih primijeniti u proizvodnji bijele čokolade. Za karakterizaciju polifenolnog sastava uzoraka i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata korištene su spektrofotometrijske metode i metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-PDA). Nakon bioaktivne karakterizacije biljnih ekstrakata provedena je senzorska analiza istih te su najbolje ocijenjeni ekstrakti primijenjeni u proizvodnji bijele čokolade. Uzorci ružmarina bogatiji su izvori polifenolnih spojeva u odnosu na koprivu i kao takvi imaju velik potencijal za širu primjenu i istraživanje u prehrambenoj industriji. Senzorskom analizom utvrđeno je kako čokolada s dodatkom hrvatske koprive ima najbolju opću prihvatljivost.

**Ključne riječi:** polifenoli, kopriva, ružmarin, čokolada, senzorska analiza

**Rad sadrži:** 28 stranica, 13 slika, 7 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

**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:** dr. sc. Danijela Šeremet

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

**Effect of the addition of rosemary and nettle extracts on the bioactive and sensory attributes of chocolate**  
Lana Kolonić, 0058218448

### Abstract:

Recently, there has been an increased interest in food products with added value on the world market. The development of such products is challenging for the scientific community and for the industry as they strive to find ingredients with positive health effects and, at the same time, acceptable sensory properties. The aim of this work was to analyse the polyphenolic composition of 2 samples of rosemary and 2 samples of nettle originating from Croatia and China and to apply their extracts in the production of white chocolate. Spectrophotometric and high-performance liquid chromatography (HPLC-PDA) methods were used to characterize the polyphenolic composition and the antioxidant capacity of the samples. After the bioactive characterization of the plant extracts, a sensory analysis was carried out and the best rated extracts were used in the production of white chocolate. Rosemary samples were richer sources of polyphenolic compounds compared to nettle and as such have great potential for wider application and research in the food industry. Sensory analysis determined that chocolate with the addition of Croatian nettle had the best overall acceptability.

**Keywords:** polyphenols, nettle, rosemary, chocolate, sensory analysis

**Thesis contains:** 28 pages, 13 figures, 7 tables, 50 references, 0 supplements

**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:** Draženka Komes, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Danijela Šeremet, PhD

**Thesis defended:**

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	LJEKOVITE BILJNE VRSTE.....	2
2.2.	KOPRIVA ( <i>Urtica dioica</i> L.) .....	2
2.2.1.	BOTANIČKI OPIS I PRIMJENA .....	2
2.2.2.	BIOAKTIVNI SASTAV .....	3
2.2.3.	BIOLOŠKA AKTIVNOST .....	3
2.3.	RUŽMARIN ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	4
2.3.1.	BOTANIČKI OPIS I PRIMJENA .....	4
2.3.2.	BIOAKTIVNI SASTAV .....	5
2.3.3.	BIOLOŠKA AKTIVNOST .....	6
2.4.	FUNKCIONALNI PROIZVODI S BILJNIM DODACIMA .....	7
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1.	MATERIJALI.....	9
3.1.1.	UZORCI.....	9
3.1.2.	KEMIKALIJE.....	9
3.1.3.	OPREMA.....	10
3.2.	METODE .....	11
3.2.1.	ODREĐIVANJE SUHE TVARI UZORAKA.....	11
3.2.2.	PRIPREMA VODENIH EKSTRAKATA RUŽMARINA I KOPRIVE .....	11
3.2.3.	ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA .....	11
3.2.4.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM .....	11
3.2.5.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ABTS METODOM.....	11
3.2.6.	ODREĐIVANJE UDJELA POJEDINAČNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA .....	12
3.2.7.	ODREĐIVANJE UDJELA KLOOROFILA.....	12
3.2.8.	SENZORSKA ANALIZA EKSTRAKATA RUŽMARINA I KOPRIVE .....	13
3.2.9.	FORMULACIJA ČOKOLADA .....	13
3.2.10.	ODREĐIVANJE BIOAKTIVNOG SASTAVA ČOKOLADA .....	13
3.2.11.	SENZORSKA ANALIZA ČOKOLADA .....	13
3.2.12.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	14
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	14
4.1.	UDIO SUHE TVARI U UZORCIMA RUŽMARINA I KOPRIVE.....	14
4.2.	UDIO UKUPNIH POLIFENOLA U UZORCIMA RUŽMARINA I KOPRIVE.....	15
4.3.	ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET RUŽMARINA I KOPRIVE .....	16

4.4.	POLIFENOLNI PROFIL UZORAKA RUŽMARINA I KOPRIVE .....	17
4.5.	UDIO KLOOROFILA U RUŽMARINU I KOPRIVI.....	18
4.6.	SENZORSKA ANALIZA BILJNIH UZORAKA.....	18
4.7.	BIOAKTIVNI SASTAV NOVOFORMULIRANIH ČOKOLADA .....	20
4.8.	SENZORSKA ANALIZA ČOKOLADA .....	22
5.	ZAKLJUČCI .....	23
6.	POPIS LITERATURE .....	24

## 1. UVOD

Konditorski proizvodi neizostavan su dio prehrane kako djece, tako i odraslih, a posebno atraktivna je čokolada. Međutim, osim samog okusa, potrošači sve više obraćaju pažnju na „zdravije formulacije“ proizvoda pa tako traže čokoladu koja ne utiče samo želju za slatkim, već pruža i potencijalne zdravstvene prednosti. Jedan od načina da se zadovolje potrebe tržišta je dodavanje funkcionalnih sastojaka prehrambenim proizvodima. Ideja o kombiniranju čokolade s ljekovitim biljkama, iako zvuči prilično inovativno, ukorijenjena je u dugoj povijesti korištenja biljaka u prehrani zbog njihovih zdravstvenih učinaka. Kroz povijest su se razne kulture oslanjale na ljekovite bilje od kojih su izrađivali tradicionalni pripravci. Spajajući ove tradicionalne prakse sa suvremenom tehnologijom proizvodnje čokolade, proizvođači mogu razviti čokoladu koja, ne samo da oduševljavaju jedinstvenim okusom, već imaju i pozitivne učinke na zdravlje.

Porast potražnje za funkcionalnom hranom, hranom koja nudi dodatne zdravstvene prednosti osim zadovoljavanja osnovnih nutritivnih potreba, rezultirao je povećanom potražnjom za konditorskim proizvodima s dodanom vrijednošću. Bilo da se radi o antioksidacijskim svojstvima zelenog čaja, umirujućim učincima lavande ili dobrobitima đumbira na probavni sustav, svaka ljekovita biljka nudi svoj jedinstveni doprinos obogaćivanju čokolade, a dodatak ljekovitih biljnih vrsta u čokoladu predstavlja priliku za inovaciju i isticanje na sve konkurentnijem tržištu. Kopriva i ružmarin su zanimljive biljne vrste koje unatoč potvrđenim zdravstvenim učincima još uvijek nemaju širu primjenu u prehrambenoj industriji.

Cilj ovog rada bio je razviti funkcionalne formulacije bijele čokolade dodatkom ekstrakta koprive i ružmarina, podrijetlom iz Hrvatske i Kine. U tu svrhu provedena je analiza polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta u biljnim uzorcima primjenom spektrofotometrijske i kromatografske metode (HPLC-DAD), te je provedena senzorska analiza istih. Novoformuliranim čokoladama s biljnim dodacima određen je bioaktivni potencijal i provedena je senzorska analiza istih.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Ljekovite biljne vrste

Pojam ljekovite biljke odnosi se na veliku grupu biljaka koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zbog bogatog bioaktivnog sastava te imaju dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini, kao i u otkrivanju novih sintetskih lijekova [1]. Različiti dijelovi biljaka sadrže različite spojeve pa tako u medicinske svrhe mogu biti korišteni cvjetovi, listovi, korijen, sjeme, plod ili cijela biljka. Aktivni spojevi mogu imati direktan ili indirektan fiziološki i terapijski učinak [2]. Ljudi su godinama odabirali i identificirali biljke na temelju senzorskih svojstava. Posljednjih nekoliko desetljeća, odnosno, od izuma jednostavnih analitičkih tehnika, vidljiv je napredak u potvrđivanju bioloških učinaka putem sofisticiranijih instrumenata [3]. Povećani interes u istraživanja potencijalno ljekovitih biljaka može se uočiti po broju radova objavljenih u posljednja dva desetljeća. 2008. godine objavljeno je 4 686 radova s temom ljekovitih biljaka dok se 2024. taj broj popeo na preko 21 000. Većina radova, njih 58 %, objavljena je od strane autora iz Kine, Indije i Južne Koreje što je posljedica duge i ukorijenjene tradicije korištenja biljaka u ljekovite svrhe u Aziji [4]. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO - World Health Organization) definira tradicionalne medicinske biljke kao prirodne biljne materijale korištene bez industrijske prerade za liječenje bolesti na lokalnoj ili regionalnoj razini [5]. Prema WHO podacima, više od 80 % svjetske populacije oslanja se na biljne tradicionalne pripravke kao primarni izvor zdravstvene zaštite. Ova brojka ne odnosi se samo na Kinu i Indiju, već i na brojne zemlje Zapada [6].

### 2.2. Kopriva (*Urtica dioica* L.)

#### 2.2.1. Botanički opis i primjena

Kopriva, botaničkog naziva *Urtica dioica* L., višegodišnja je biljka koja pripada porodici Urticaceae. Široko je rasprostranjena po Europi, Aziji, Sjevernoj Americi te sjevernom dijelu Afrike, na područjima do 1800 metara nadmorske visine [7]. Stabljika ove biljke je četverokutna s rastresitim kolenhimom na svakom bridu, a može narasti do 2 metra visine. Listovi su duguljasti i ovalni, blago obrnuto srolikog oblika, fino nazubljeni na rubovima i tamnije boje na gornjoj strani lista od one okrenute prema tlu (Slika 1). Trihomi na površini listova i stabljike sadrže sekret bogat histaminom, mravljom kiselinom, acetilkolinom i serotoninom te pri dodiru ostavljaju osjećaj žarenja [8]. Kopriva je korištena kao prirodni lijek preko 2000 godina, no tek je u nekoliko posljednjih desetljeća uočen puni potencijal biljke primjenom naprednih analitičkih metoda i identifikacijom kemijskih struktura i farmakološkog učinka pojedinih aktivnih spojeva [9]. Posljednjih godina koristi se u mnogim pripravcima,



poput suhих listova u biljnim infuzijama ili u kombinaciji s drugim biljem, kao i za juhe, infuzije i ekstrakte [10].



**Slika 1.** Kopriva (*Urtica dioica* L.) [11]

### 2.2.2. Bioaktivni sastav

Svi dijelovi koprive bogati su različitim spojevima i mogu naći primjenu u ljekovite svrhe, međutim, listovi sadrže najveći udio bioaktivnih spojeva te se stoga najčešće koriste u analizama i za daljnju preradu (Tablica 1). Osim dijela biljke, na udio bioaktivnih spojeva utječu različite fenološke faze razvoja pa primjerice, starenjem biljke smanjuje se udio polifenola [12].

### 2.2.3. Biološka aktivnost

U istraživanju Khare i sur. [18] objavljeno je da kopriva u sastavu suhe tvari sadrži visoki udio polifenolnih spojeva i snažno antioksidacijsko djelovanje. Ekstrakti koprive pokazali su protuupalno djelovanje sprečavanjem degranulacije inhibiranjem upalnih prostaglandina i triptaze mastocita [19]. Ghaima i sur. [20] proučavali su antibakterijsko djelovanje etil-acetatnog ekstrakta koprive na bakterije *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Aeromonas hydrophila* metodom difuzije u agar-želatinu, koristeći cefalotin kao standard. Ekstrakt ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pokazao je inhibicijske zone od 14, 24, 10, 22 i 20 mm, dok su zone inhibicije cefalotina bile 20, 22, 20, 18 i 24 mm. Rezultati su pokazali da je ekstrakt djelotvoran protiv svih testiranih bakterija [19]. Bnouham i sur. [21] izazvali su hiperglikemiju kod štakora koristeći glukozu i aloksan kako bi istražili antidijabetički učinak vodenog ekstrakta koprive. Ekstrakt nije smanjio razinu glukoze u krvi štakora s dijabetesom

izazvanim aloksanom, međutim, kod štakora s hiperglikemijom izazvanom glukozom, 250 mg kg<sup>-1</sup> vodenog ekstrakta, primijenjenog 30 minuta prije unosa glukoze, značajno je smanjilo razinu glukoze u krvi. Ekstrakt je smanjio razinu glukoze za 33 % u usporedbi s kontrolnom grupom nakon jednog sata. Ovi *in vivo* rezultati pokazuju značajan antihiperglikemijski učinak ekstrakta koprive kod štakora i temelj su za provođenje dodatnih istraživanja [21].

**Tablica 1.** Bioaktivni spojevi u listovima koprive

Kemijska skupina	Nazivi spojeva	Referenca
Flavonoidi	amentoflavon, apiin, apigenin, apigenin 7-O-β-D-glukozid, baikalin, baikalein, katehin, epikatehin, epigalokatehin galat, krizoeriol, genestein, izorhamnetin, kempferol, kempferol 3-O-β-D-glukozid, luteolin, luteolin 7-O-β-D-glukozid, miricetin, naringenin, kvercetin, kvercetin 3-O-β-D-glukozid, kvercetin 3-O-β-D-galaktozid, rutin, viteksin	[13,14,15]
Fenolne kiseline	galna kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, protokatehinska kiselina, gentizinska kiselina, cimetna kiselina, kafeinska kiselina, <i>p</i> -kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, klorogenska kiselina, sinapinska kiselina	[13,14,15]
Aminokiseline	alanin, γ-aminomaslačna kiselina (GABA), glutaminska kiselina, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, tirozin, valin	[16]
Karotenoidi	β-karoten, izomeri luteina, neoksantin, violaksantin	[17]
Organske kiseline	octena kiselina, limunska kiselina, mravlja kiselina, jabučna kiselina, jantarna kiselina	[16]
Masne kiseline	arahidonska kiselina, arahidna kiselina, behenska kiselina, dodekanska kiselina, eruka kiselina, palmitinska kiselina, palmitoleinska kiselina, stearinska kiselina, trikozilna kiselina, laurinska kiselina	[14,17]

### 2.3. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

#### 2.3.1. Botanički opis i primjena

Ružmarin je zimzelena višegodišnja grmolika biljka koja može narasti do visine od 1,8 metara i pripada porodici Lamiaceae. Listovi su bez peteljki, 1-4 centimetra duljine i zelene boje s gornje strane. Donja strana listova bjelkaste je boje zbog brojnih žljezdanih i ne žljezdanih trihoma (Slika 2). Različite sorte ružmarina razlikuju se u veličini listova, načinu rasta grana te

boji i veličini cvjetova (bijela, plava, roza i ljubičasta). Cvjetovi su mali i raspoređeno u kratke grozdove [22]. Stari Egipćani koristili su kreme i ulja kako bi se zaštitili od visokih pustinjskih temperatura i vrućine, a jedan od sastojaka tih proizvoda bio je ružmarin, koji su kombinirali s ekstraktima drugih biljaka poput mirte, timijana, mažurana, kamilice i cedra [23]. Kroz stoljeća, ružmarin se koristio u narodnoj medicini kao antispazmotik, diuretik, antiepileptik, karminativ, za bubrežne kolike, antireumatik i ekspektorans, kao i za liječenje dijabetesa, dismenoreje, srčanih bolesti te za ublažavanje respiratornih poremećaja [24,25].



**Slika 2.** Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) [26]

### 2.3.2. Bioaktivni sastav

Bioaktivni spojevi ružmarina mogu se izolirati iz biljnog materijala ekstrakcijskim metodama kao što su maceracija, destilacija, ekstrakcija superkričnim fluidom, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom, itd. U Tablici 2 prikazani su neki od najzastupljenijih bioaktivnih spojeva u ružmarinu. Bioaktivni kemijski sastav biljke ovisi o mnogim faktorima, kao što su podrijetlo biljke, vremenski uvjeti u kojima je biljka rasla te starost. Sukladno tome, moguća su odstupanja od navedenih podataka [27].

**Tablica 2.** Glavni bioaktivni spojevi u ružmarinu [27]

Kemijska skupina	Nazivi spojeva
Monoterpeni	eukaliptol, kamfor, $\alpha$ -pinen, $\beta$ -pinen, borneol, $\beta$ -kariofilen, verbenon
Diterpeni	karnozinska kiselina, karnozol, rozmanol, epirozmanol, izorozmanol,
Triterpeni	oleanolna kiselina, ursolna kiselina, betulin, $\alpha$ -amirin, $\beta$ -amirin
Flavonoidi	luteolin, apigenin, genkvanin, diosmetin, hispidulin, cirsimaritin
Fenolne kiseline	kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina

### 2.3.3. Biološka aktivnost

Provedeno je nekoliko *in vitro* istraživanja čiji je cilj bio dokazivanje antioksidacijske aktivnosti glavnih izoliranih spojeva: karnozola, karnozinske kiseline, rozmanola, ružmarinske kiseline, oleanolne i ursolne kiseline. Ove studije pokazale su antioksidacijski potencijal fitokemikalija ružmarina, koji je povezan s drugim biološkim učincima zbog njihove sposobnosti da neutraliziraju reaktivne spojeve kisika [28,29]. Eksperimentalne *in vitro* studije koje su ispitivale minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), minimalne baktericidne koncentracije i dinamičke procese smrti pokazale su mogući sinergijski učinak antimikrobnih spojeva u eteričnom ulju ružmarina [30]. Ove studije testirale su karnozinsku kiselinu, karnozol, ružmarinsku kiselinu, oleanolnu kiselinu, ursolnu kiselinu i eterično ulje ružmarina protiv Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*), Gram-negativnih bakterija (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*) i kvasce i plijesni (*Candida albicans* i *Aspergillus niger*). Svi rezultati pokazali su izraženu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost. Također je utvrđeno da karnozinska kiselina pokazuje antivirusnu aktivnost protiv humanog respiratornog sincicijskog virusa [31]. U predkliničkim fazama istraživanja, eterično ulje ružmarina koristilo se topikalno za mišićne i reumatske bolove pleuritisa inducirano karagenanom i oticanja šapa, također inducirano karagenanom, na štakorima. Ova istraživanja potvrdila su da eterično ulje može značajno smanjiti inducirani edem u roku od 1–4 sata te značajno smanjiti volumen pleuralnog eksudata, što ga čini i protuupalnim i antinociceptivnim [32,33].

#### 2.4. Funkcionalni proizvodi s biljnim dodacima

Proizvođači sve više uviđaju potencijal sastava biljnih vrsta u unaprjeđenju nutritivne i bioaktivne vrijednosti proizvoda, ali i produljenju roka trajanja, odnosno, konzerviranja hrane. Ekstrakt ružmarina prepoznat je u prehrambenoj industriji kao prirodna alternativa sintetskim antioksidansima poput BHA ili BHT. Ekstrakti ružmarina široko su korišteni u raznim prehrambenim proizvodima kao što su meso, perad i plodovi mora, umaci i preljevi, čips od krumpira i pekarski proizvodi. Za primjenu u proizvodnji pića često se koriste ekstrakti ružmarina koji sadrže hidrofilne antioksidanse (npr. ružmarinska kiselina). Ekstrakt ružmarina vrlo je učinkovit u poboljšanju oksidacijske stabilnosti jestivih ulja i masti. Na temelju relativne otpornosti na oksidaciju raznih ulja i masti, koja se može pratiti pomoću instrumenta za oksidacijsku stabilnost (OSI), može se izračunati Faktor zaštite (PF) za određenu dozu ekstrakta ružmarina. Faktor zaštite pokazuje stupanj poboljšanja stabilnosti ulja ili masti postignut ekstraktom ružmarina. Ekstrakt ružmarina obično se dodaje raznim mesnim i morskim proizvodima kako bi se spriječila oksidacija lipida, usporilo stvaranje neželjenih okusa i poboljšala stabilnost boje. U termički obrađenim mesnim proizvodima, uključujući kuhane, ohlađene i prethodno kuhane, kao i smrznute mesne proizvode, oksidacija lipida dovodi do razvoja okusa „warmed-over flavor” (WOF). Ovaj nepoželjni okus često se opisuje kao „ustajao”, „sličan kartonu” ili „užegao”. WOF, koji nastaje zbog oksidacije masti u mesu, može se pojaviti i u sirovim mesnim proizvodima koji su bili izloženi oštećenju membrana. Primarni oksidacijski produkti razgrađuju se u sekundarne oksidacijske produkte poput pentanala, heksanala i 2,4-dekadienala, koji se detektiraju kao WOF. Ovaj kvar okusa mesa može se učinkovito prevenirati korištenjem ekstrakta ružmarina [34]. Američka kompanija Wildwood chocolate u svojem asortimanu nudi karamele s dodatkom ružmarina (Slika 3), dok francuska tvrtka Georges Verquin proizvodi bombone s dodatkom meda i ružmarina. Haigh's chocolate, sa sjedištem u Australiji, na tržištu nudi karamele s dodatkom orašastih plodova, limuna i ružmarina. Lagusta's Luscious bavi se proizvodnjom veganskih konditorskih proizvoda, a posebno se ističu praline s dodatkom ružmarina i morske soli. Chocolaterie Bernard Callebaut proizvodi čokoladne pločice s dodatkom ružmarina i morske soli s čilijem, dok tvrtka Tempered proizvodi tamnu čokoladu s dodatkom ružmarina i maslinovog ulja. Cedeño-Pinos i sur. [35] proveli su istraživanje dodavanjem 0.26 g vodenog ekstrakta ružmarina po kilogramu smjese za izradu žele bombona. Polifenoli ružmarina pokazali su otpornost na kuhanje, djelovali su kao sekundarni antioksidansi i pokazali dobru interakciju s ostalim sastojcima želea. Zaključak je bio da vodeni ekstrakti ružmarina mogu biti dodani u prihvatljivim udjelima u formulacije žele bombona što dovodi do veće oksidacijske stabilnosti i povećanog udjela polifenola.

Krawęcka i sur. [36] proveli su istraživanje s ciljem analize učinka dodatka koprive na kemijski sastav, uključujući udio odabranih minerala i pigmentata, *in vitro* glikemijski indeks te kvalitetu kuhanja i senzorsku kvalitetu ekstrudirane tjestenine. Dodavanjem koprive značajno se povećao udio pepela i mineralnih tvari, posebno kalcija, željeza, kalija i magnezija. Uz povećanje udjela koprive, istraživanje je otkrilo značajno povećanje ukupnog udjela prehrambenih vlakana, uključujući frakciju netopljivih vlakana, kao i značajno povećanje udjela pigmentata. Dodatak koprive od 1-5 % u tjesteninu utjecao je na kvalitetu kuhanja produžujući optimalno vrijeme kuhanja i povećavajući gubitak suhe tvari. Najniže vrijednosti hidrolize škroba i vrijednosti glikemijskog indeksa određene su kod tjestenine s 3 % dodatka koprive [36]. Tvrтка Reutter ekstrakt koprive (1 %) koristi za izradu tvrdih bombona (Slika 4). Launette, sa sjedištem u Engleskoj, u prodaji nude čokoladu s proljetnom koprivom, dok kompanija Taiga u asortimanu sadrži pesto s dodatkom 26 % koprive. Forage Botanicals u prodaju su stavili mješavinu za pripremu vruće čokolade s dodatkom koprive i lista maline, a Galiano Chocolate u sezonskoj ponudi 2022. godine nudili su pločice od bijele čokolade s dodatkom koprive.



Karamele

Čokolada

Tvrđi bomboni

**Slika 3.** Proizvodi s dodatkom ružmarina [37]



Tvrđi bomboni

Pesto

Mješavina za vruću čokoladu

**Slika 4.** Proizvodi s dodatkom koprive [38]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorci

U radu su ispitivana 4 biljna uzorka, 2 uzorka ružmarina, hrvatskog (uzorak HR) i kineskog podrijetla (uzorak KR) i 2 uzorka koprive, također hrvatskog (uzorak HK) i kineskog (uzorak KK) podrijetla. Biljni uzorci su nakon sušenja na zraku, na sobnoj temperaturi, usitnjeni i prosijani pri čemu se u svim daljnjim analizama koristila frakcija veličine čestica  $< 450 \mu\text{m}$ . Za izradu čokolade koristila se bijela čokoladna masa proizvođača Kandit (Hrvatska).

##### 3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) ili HPLC čistoće.

Određivanje ukupnih polifenola

- Demineralizirana voda
- Galna kiselina ( $> 97 \%$ ), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Hrvatska)
- Natrijev karbonat, Kemika (Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- 1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), Fluka (Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Fluka (Njemačka)
- Metanol, J. T. Baker (SAD)

#### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Fluka (Njemačka)
- Demineralizirana voda
- Etanol, Gram-mol d.o.o. (Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Njemačka)

#### Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)

- Acetonitril, Fischer Scientific (UK)
- Kafeinska kiselina (> 97 %), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Kafeoil maleinska kiselina ( $\geq$  95 %), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Mravlja kiselina, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Francuska)
- Rutin trihidrat (> 97 %), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Ružmarinska kiselina (97 %), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Voda HPLC kvalitete

#### Određivanje klorofila

- Aceton

#### 3.1.3. Oprema

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (SAD)
- Laboratorijski sušionik, Instrumentaria (Hrvatska)
- Liofilizator, Martin Christ GmbH (Njemačka)
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg (Njemačka)
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Francuska)
- Rotacioni vakuum uparivač RV8, IKA (Njemačka)
- Spektrofotometar, Helios, ThermoSpectronic (Velika Britanija)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (SAD)
- Ultrazvučna kupelj (S 60 H) Elmasonic, Elma (Njemačka)
- Vodena kupelj, Tehnica Železniki (Slovenija)



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje suhe tvari uzoraka

Suha tvar uzoraka određena je AOAC 930.15 metodom sušenjem u laboratorijskom sušioniku u aluminijskim posudicama na 105 °C do konstantne mase [39].

### 3.2.2. Priprema vodenih ekstrakata ružmarina i koprive

Ekstrakcija se provodila u vodenoj kupelji na 100 °C kroz 10 min uz omjer uzorak/otapalo 1g:100 mL. Kao otapalo koristila se demineralizirana voda. Nakon provedene ekstrakcije, slijedilo je hlađenje i centrifugiranje (9500 rpm, 4 °C, 10 min), a dobiveni ekstrakti čuvali su se na +4 °C do daljnjih analiza. Za svaki uzorak, ekstrakcija je rađena u paraleli.

### 3.2.3. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Udio ukupnih polifenola u dobivenim ekstraktima analiziran je koristeći metodu modificiranu prema radu Singleton i Rossi [40]. U staklene epruvete otpipetiralo se 7,9 mL demineralizirane vode, 100 µL pripremljenog vodenog ekstrakta, 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješala. Reakcija je trajala 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjerila apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba pripremila se na isti način kao i uzorci, samo je umjesto uzorka sadržavala isti volumen demineralizirane vode. Za svaki uzorak ekstrakta biljnih uzorka rađene su dvije paralele. Baždarna krivulja izrađena je koristeći galnu kiselinu kao standard te su rezultati izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (EGK).

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet DPPH metodom određen je prema metodi Brand-Williams i sur. [41]. Pripremila se 0,094 mM otopina DPPH u metanolu čija apsorbancija na 515 nm mora biti ~1. U epruvetu se otpipetiralo 100 µL pripremljenog vodenog ekstrakta i dodalo 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 min po dodatku otopine DPPH mjerila apsorbancija pri 515 nm. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala 100 µL metanola. Za svaki uzorak ekstrakta biljnih uzorka rađene su dvije paralele. Baždarna krivulja izrađena je koristeći Trolox kao standard te su rezultati izraženi kao ekvivalenti Trolox-a.

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Antioksidacijski kapacitet ABTS metodom određen je prema metodi Re i sur. [42]. Pripremila se otopina ABTS+ radikala miješanjem 88 µL (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata (persulfat) s vodenom otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Pripremljenu

otopinu je potrebno omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Prije analize otopina se razrijedila etanolom do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine na 734 nm iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Volumen od 20  $\mu\text{L}$  pripremljenog vodenog ekstrakta biljnog uzorka pomiješao se s 2 mL otopine ABTS+ radikala u epruveti te se izmjerila apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 min. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala 20  $\mu\text{L}$  etanola. Za svaki uzorak ekstrakta biljnih uzorka rađene su dvije paralele. Baždarna krivulja izrađena je koristeći Trolox kao standard te su rezultati izraženi kao ekvivalenti Trolox-a.

### 3.2.6. Određivanje udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva

Pojedinačni polifenolni identificirani su i kvantificirani primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*-HPLC). U analizi je korištena kromatografska kolona Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å) (Agilent Technologies, SAD) čija je temperatura tijekom analize iznosila 25 °C. Uzorak je injektiran u sustav automatskim injektorom u volumenu od 5  $\mu\text{L}$ , a elucija je provedena gradijentno dvokomponentnom mobilnom fazom (A-1 % (v/v) mravlja kiselina u vodi; B-1 % (v/v) mravlja kiselina u acetonitrilu) i pri protoku od 1 mL min<sup>-1</sup> (Tablica 3). Detekcija analita omogućena je primjenom detektora s nizom fotodioda (engl. *Diode Array Detector*-DAD), snimanjem pri valnim duljinama koji odgovaraju maksimumima apsorpcijskih spektara različitih polifenolnih spojeva koji su analizirani ovom metodom. Identifikacija pikova na kromatogramima uzoraka provedena je usporedbom retencijskih vremena s poznatim standardima, a kvantifikacija izradom baždarnih krivulja koristeći odgovarajuće standarde.

**Tablica 3.** Režim elucije za primijenjenu HPLC metodu

Vrijeme (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL min)
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

### 3.2.7. Određivanje udjela klorofila

Određivanje udjela klorofila provedeno je prema metodi opisanoj u radu Huang i sur. [43]. Oko 100-200 mg usitnjenih biljnih uzoraka ekstrahiralo se s 50 mL 80 %-tnog acetona te se snažno

miješalo 2 min i potom profiltriralo kroz filter papir. Potom se izmjerila apsorbancija filtrata termostatiranog na 30 °C na valnim duljinama od 663 nm za klorofil a i 645 nm za klorofil b.

### 3.2.8. Senzorska analiza ekstrakata ružmarina i koprive

Senzorska analiza pripremljenih ekstrakata provedena je prema metodi ISO 8589:2007 [44]. Senzorsku analizu provodio je interni panel Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska) koji se sastojao od 20 članova starosti između 20 i 50 godina. Panelisti su ocjenjivali gorčinu, slatkoću, trpkost, miris, aromu i opću prihvatljivost. Skala ocjena bila je od 1 (najmanja vrijednost/najmanje izraženo) do 9 (najveća vrijednost/najviše izraženo). Osim ocjenjivanja uzoraka, panelisti su bilježili arome prisutne u pojedinim uzorcima prema kojima su napravljeni aromatski kotači.

### 3.2.9. Formulacija čokolada

Za formulaciju čokolada s dodatkom biljnih ekstrakata korištena je bijela čokoladna masa u koju je, u rastaljenom obliku (40 °C), dodano 2 % liofiliziranih ekstrakta ružmarina (uzorak Č\_R) ili koprive (uzorak Č\_K) koji su pokazali najbolje senzorske karakteristike i najizraženija bioaktivna svojstva. Nakon dodatka liofiliziranih ekstrakta, čokoladna masa je homogenizirana i izlivena u kalupe.

Liofilizirani ekstrakti pripremljeni su koncentriranjem vodenih ekstrakata do 10x manjeg volumena koristeći rotacioni uparivač nakon čega su liofilizirani (-40 °C, 24 h) kako bi se dobio ekstrakt u praškastom obliku za inkorporaciju u čokolade.

### 3.2.10. Određivanje bioaktivnog sastava čokolada

Čokolade (3 g) su odmašćene koristeći petroleter (2 x 10 mL). Odmašćeni dio čokolada korišten je za analizu bioaktivnog sastava čokolada. Ekstrakt je pripremljen na način da je u odmašćen dio dodano 25 mL 80 %-tnog metanola. Ekstrakcija se provodila u vodenoj kupelji zagrijanoj na 70 °C kroz 10 min, nakon čega je slijedilo miješanje na magnetskoj miješalici kroz 15 min. Po završetku ekstrakcije, uzorak je centrifugiran (9500 rpm, 10 min) te je izdvojeni supernatant korišten za analizu udjela ukupnih polifenola (poglavlje 3.2.3.), antioksidacijskog kapaciteta (poglavlja 3.2.4. i 3.2.5.), i udjela pojedinačnih polifenola (poglavlje 3.2.6.).

### 3.2.11. Senzorska analiza čokolada

Senzorska analiza pripremljenih čokolada provedena je prema metodi ISO 8589:2007 [44]. Senzorsku analizu provodio je interni panel Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Hrvatska) koji se sastojao od 20 članova starosti između 20 i 50 godina. Uzorci obogaćenih čokolada su bili servirani pri sobnoj temperaturi te su uspoređivani s

kontrolnim uzorkom (bijela čokolada). Ocjenjivani su parametri gorčine, slatkoće, trpkosti, biljni okus, lom te opća prihvatljivost. Ljestvica intenziteta procjene jačine bila je od 1 (izrazito nizak intenzitet/jačina parametra) do 9 (izrazito visoki intenzitet/jačina parametra). Opća prihvatljivost čokolada ocjenjivana je hedonističkom skalom od 1 do 9, pri čemu 1 izražava izrazito nepoželjan proizvod, a 9 izrazito poželjan proizvod.

### 3.2.12. Statistička obrada rezultata

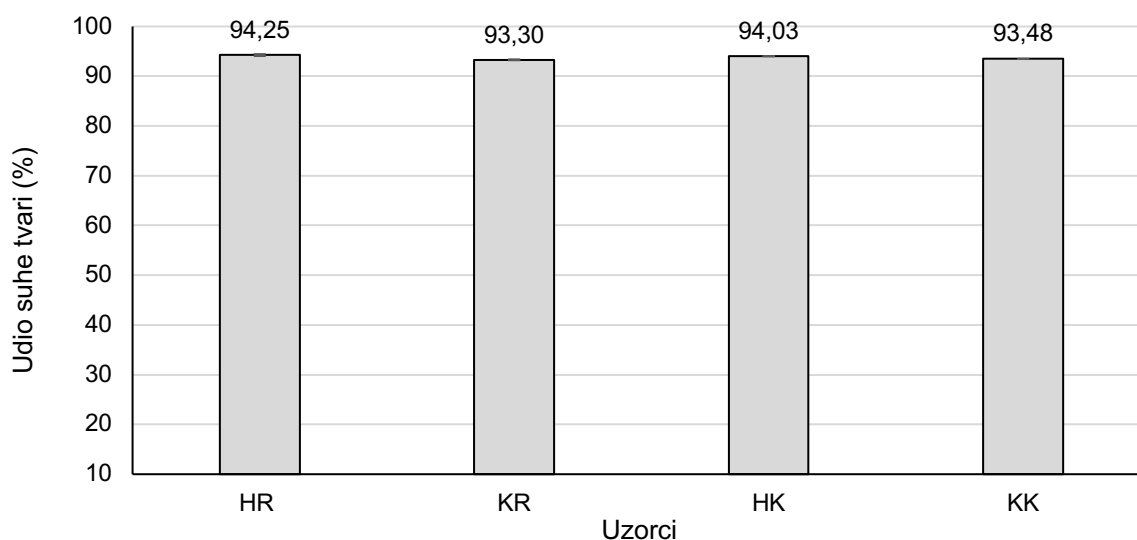
Statistička obrada rezultata provedena je u programu Statistica (v.14, TIBCO Software Inc.). Koristili su se Studentov t-test i jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bila je bioaktivna i senzorska karakterizacija vodenih ekstrakata ružmarina i koprive, hrvatskog i kineskog podrijetla u svrhu njihovog dodatka u nove formulacije bijele čokolade. Pripremljenim ekstraktima određen je udio ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet DPPH i ABTS metodama te polifenolni profil HPLC-DAD metodologijom. Ekstrakti najizraženijih bioaktivnih svojstava i poželjnih senzorskih karakteristika, u liofiliziranom obliku, koristili su se za obogaćivanje bijele čokolade kojima su također određena bioaktivna i senzorska svojstva u usporedbi s čokoladom bez dodataka.

### 4.1. Udio suhe tvari u uzorcima ružmarina i koprive

Udio suhe tvari uzoraka ružmarina i koprive, hrvatskog i kineskog podrijetla, prikazan je na Slici 5.

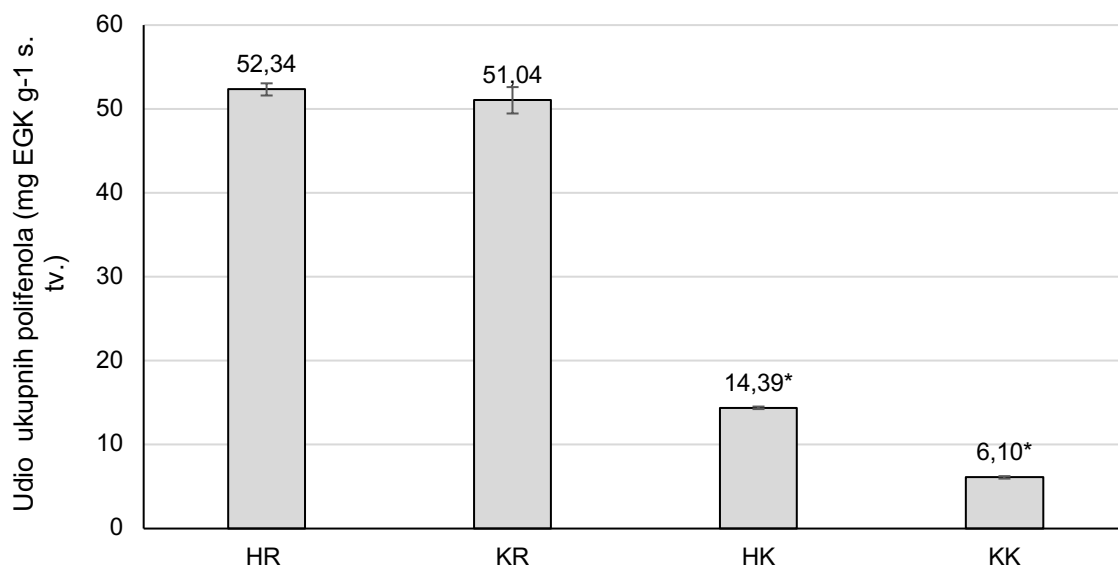


**Slika 5.** Udio ukupne suhe tvari u koprivi i ružmarinu

Udio suhe tvari uzoraka bio je u uskom rasponu od 93,30 % (uzorak KR), do 94,25 %, (uzorak HR). Rezultati određivanja bioaktivnog sastava analiziranih uzoraka u poglavljima 4.2.-4.5. izraženi su po gramu suhe tvari uzoraka (g. s.tv.).

#### 4.2. Udio ukupnih polifenola u uzorcima ružmarina i koprive

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja udjela ukupnih polifenola ružmarina i koprive, hrvatskog i kineskog podrijetla, prikazani su na Slici 6.



**Slika 6.** Udio ukupnih polifenola u koprivi i ružmarinu

s.tv. – suha tvar uzorka; EGK – ekvivalenti galne kiseline; \*-statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između uzoraka (unutar iste biljne vrste) određena t-testom.

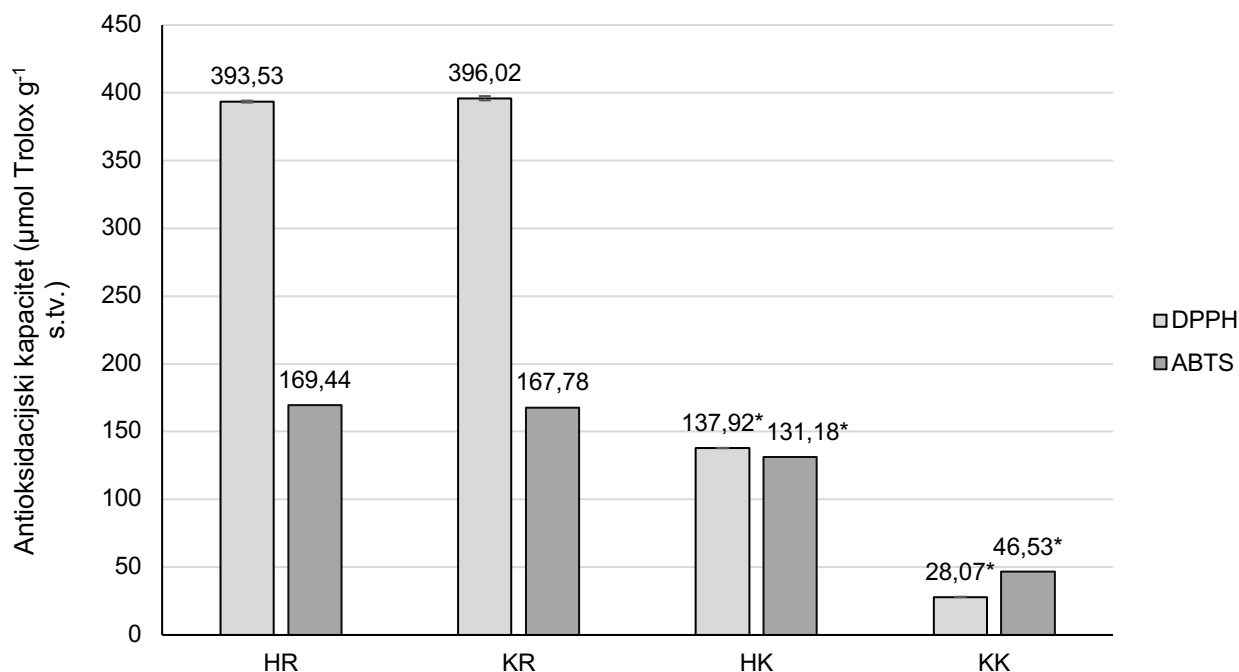
U uzorku hrvatskog ružmarina (HR) određen je udio ukupnih polifenola od 52,34 mg EGK g<sup>-1</sup> s.tv., a u kineskom ružmarinu (KR) 51,04 mg EGK g<sup>-1</sup> s.tv. te između tih vrijednosti nije uočena statistički značajna ( $p > 0,05$ ) razlika. U odnosu na ružmarin, uzorci koprive bili su siromašni ukupnim polifenolima. Udio polifenola u uzorku hrvatske koprive (HK) iznosio je 14,39 mg EGK g<sup>-1</sup> s.tv., dok je kineska kopriva (KK) sadržavala statistički značajno ( $p < 0,05$ ) manji udio ukupnih polifenola (6,10 mg EGK g<sup>-1</sup> s.tv.).

Otles i sur. [13] odredili su viši udio ukupnih polifenola, od 20,24 mg EGK g<sup>-1</sup> s.tv., u listovima koprive s područja Turske, dok su Ghaima i sur. [20] izmjerili 48,3 mg EGK g<sup>-1</sup> s.tv. u listovima koprive s područja Iraka. Al-jaafreh i sur. [45] analizirali su udio ukupnih polifenola u listovima ružmarina s područja Jordana i odredili udio 72,34 mg EGK g<sup>-1</sup> s.tv., što je viša vrijednost nego u ovome istraživanju. Cedeño-Pinos i sur. [35] određivali su udio polifenola u dva uzorka

ružmarina iz Španjolske te odredili udjele od 145,6 i 73,9 mg EGK g<sup>-1</sup> uzorka. Razlike u dobivenim vrijednostima ukupnih polifenola mogu se objasniti različitim uvjetima rasta biljaka i izloženosti stresnim situacijama (npr. UV zračenje i nametnici) [46].

#### 4.3. Antioksidacijski kapacitet ružmarina i koprive

Uzorcima ružmarina i koprive, hrvatskog i kineskog podrijetla, izmjeren je antioksidacijski kapacitet DPPH i ABTS metodama. Rezultati su prikazani na Slici 7.



**Slika 7.** Antioksidacijski kapacitet koprive i ružmarina izmjeren pomoću DPPH i ABTS metoda

s.tv. – suha tvar uzorka; \*-statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između uzoraka (unutar iste biljne vrste i metode određivanje antioksidacijskog kapaciteta) određena t-testom.

Antioksidacijski kapacitet ružmarina, određen primjenom obje metode, nije se statistički značajno ( $p > 0,05$ ) razlikovao ovisno o podrijetlu. Tako je u hrvatskom ružmarinu DPPH metodom određen antioksidacijski kapacitet od 393,53 µmol Trolox g<sup>-1</sup> s.tv., dok je u kineskom ružmarinu, istom metodom, izmjereno 396,02 µmol Trolox g<sup>-1</sup> s.tv. Rezultati mjerenja ABTS metodom iznosili su 169,44 µmol Trolox g<sup>-1</sup> s.tv. za hrvatski ružmarin te 167,78 µmol Trolox g<sup>-1</sup> s.tv. za kineski ružmarin. Hrvatska kopriva pokazala je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) veću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta, određenog i DPPH i ABTS metodom, u odnosu na kinesku koprivu. Antioksidacijski kapacitet hrvatske koprive, određen DPPH metodom, iznosio je 137,92 µmol Trolox g<sup>-1</sup> s.tv., a kineske 28,07 µmol Trolox g<sup>-1</sup> s.tv. Prema ABTS metodi, antioksidacijski kapacitet hrvatske koprive iznosio je 131,18 µmol Trolox g<sup>-1</sup> s.tv., a kineske

46,53  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  s.tv. Rezultati su u skladu s udjelom ukupnih polifenola (poglavlje 4.2.), odnosno uzorci s većim udjelom polifenola, pokazali su veći antioksidacijski kapacitet.

Otles i sur. [13] su, koristeći DPPH metodu, odredili antioksidacijski kapacitet koprive od 110,39 mg EGK  $\text{g}^{-1}$  s.tv. Al-jaafreh i sur. [45] određivali su antioksidacijski kapacitet lista ružmarina od 138,3 mg EGK  $\text{g}^{-1}$  s.tv. U istom istraživanju provedeno je mjerenje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom čija je vrijednost iznosila 125,33 mg Trolox  $\text{g}^{-1}$  s.tv.

#### 4.4. Polifenolni profil uzoraka ružmarina i koprive

U svrhu dobivanja detaljnijeg uvida u bioaktivni sastav ružmarina i koprive, hrvatskog i kineskog podrijetla, udio pojedinačnih polifenolnih spojeva određen je HPLC-DAD metodologijom. Rezultati su prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4.** Polifenolni profil uzoraka ružmarina i koprive

Uzorak	Ružmarinska kiselina ( $\text{mg g}^{-1}$ s. tv.)	Kafeinska kiselina ( $\text{mg g}^{-1}$ s. tv.)	Rutin ( $\text{mg g}^{-1}$ s. tv.)	Kafeoil maleinska kiselina ( $\text{mg g}^{-1}$ s. tv.)
Hrvatski ružmarin (HR)	13,61*	0,28*	1,47*	/
Kineski ružmarin (KR)	5,93*	0,52*	0,95*	/
Hrvatska kopriva (HK)	/	/	/	1,97
Kineska kopriva (KK)	/	/	/	/

s.tv. – suha tvar uzorka; \*-statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između uzoraka određena t-testom.

U oba uzorka ružmarina, hrvatskog i kineskog podrijetla, identificirana su 3 polifenolna spoja: ružmarinska kiselina, kafeinska kiselina i rutin. U hrvatskom ružmarinu određeno je 13,61  $\text{mg g}^{-1}$  s. tv. ružmarinske kiseline, 0,28  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv. kafeinske kiseline te 1,47  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv. rutina, a u kineskom ružmarinu 5,93  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv. ružmarinske kiseline, 0,52  $\text{mg g}^{-1}$  s. tv. kafeinske kiseline te 0,95  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv. rutina. Uočena je statistički značajna ( $p < 0,05$ ) razlika u udjelu svih identificiranih polifenolnih spojeva u uzorcima ružmarina, ovisno o podrijetlu. U uzorku hrvatske koprive identificirana je je kafeoil maleinska kiselina u udjelu od 1,97  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv., a u uzorku kineske koprive ista nije bila prisutna.

Li i sur. [47] analizirali su polifenolni profil ružmarina s područja Kine i objavili da je najzastupljeniji polifenolni spoj bila ružmarinska kiselina (5,22  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.), a objavili su i prisutnost terpena, točnije, karnozola (1,24  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.), karnozinske kiseline (2,51  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.), oleanolne kiseline (1,13  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.) i ursolne kiseline (1,02  $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.). U istraživanju

Otles i sur. [13], najzastupljeniji polifenolni spojevi lista koprive bili su kafeinska i klorogenska kiselina (60,89 mg g<sup>-1</sup> s.tv.), vanilinska kiselina (26,15 mg g<sup>-1</sup> s.tv.) te rutin (21,85 mg g<sup>-1</sup> s.tv.). Vajić i sur. [48] analizom polifenolnog sastava koprive, s područja Srbije, različitim ekstrakcijskim metodama dobili su rezultate udjela kafeoil maleinske kiseline u rasponu od 75,8 do 106,1 g kafeinske kiseline mL<sup>-1</sup> ovisno o duljini ekstrakcije.

#### 4.5. Udio klorofila u ružmarinu i koprivi

U uzorcima ružmarina i koprive, hrvatskog i kineskog podrijetla, određen je udio klorofila a i b te ukupni klorofil, a rezultati su prikazani u Tablici 5.

**Tablica 5.** Udio klorofila u ružmarinu i koprivi

Uzorak	Klorofil a (mg g <sup>-1</sup> s.tv.)	Klorofil b (mg g <sup>-1</sup> s.tv.)	Ukupni klorofil (mg g <sup>-1</sup> s.tv.)
Hrvatski ružmarin (HR)	0,22 ± 0,00*	0,99 ± 0,02*	0,37 ± 0,02*
Kineski ružmarin (KR)	1,15 ± 0,01*	1,53 ± 0,01*	1,63 ± 0,00*
Hrvatska kopriva (HK)	3,10 ± 0,03*	1,02 ± 0,02*	4,63 ± 0,04*
Kineska kopriva (KK)	1,08 ± 0,19*	0,55 ± 0,08*	1,63 ± 0,20*

s.tv. – suha tvar uzorka; \*-statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između uzoraka (unutar iste biljne vrste) određena t-testom.

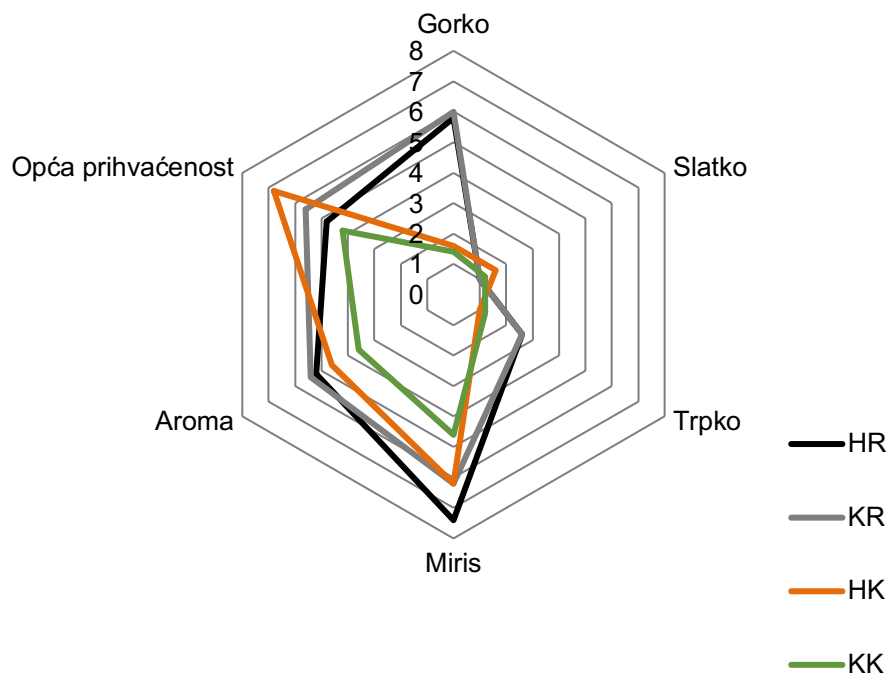
Hrvatska kopriva, prema dobivenim rezultatima mjerenja, ima najveći udio ukupnog klorofila od 4,63 mg g<sup>-1</sup> s.tv. Slijede ju kineska kopriva i kineski ružmarin, u udjelu od 1,63 mg g<sup>-1</sup> s.tv., dok je u hrvatskom ružmarinu udio bio najniži (0,37 mg g<sup>-1</sup> s.tv.). Između uzoraka unutar iste biljne vrste uočena je statistički ( $p < 0,05$ ) značajna razlika u udjelu ukupnog klorofila pri čemu je kineski ružmarin imao viši udio ukupnog klorofila od hrvatskog, a hrvatska kopriva viši udio ukupnog klorofila od kineske koprive.

Repajić i sur. [49] određivali su udio ukupnog klorofila u listovima koprive u nizu uzoraka s kontinentalnog, priobalnog i planinskog područja Hrvatske. Rezultati su bili u rasponu od 0,04 do 19,34 mg g<sup>-1</sup> s.tv. te je utvrđeno da udio klorofila, osim o području rasta, ovisi i o fenološkoj fazi biljke. U istraživanju Andrade i sur. [27], udio ukupnog klorofila u ekstraktu listova ružmarina iznosio je 2,9 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.6. Senzorska analiza biljnih uzoraka

Rezultati senzorske analize vodenih ekstrakata ružmarina i koprive, hrvatskog i kineskog podrijetla, prikazani su na Slici 8. Uz senzorsku analizu provedena je deskriptivna analiza prema kojoj su napravljeni kotači arome (Slika 9 i Slika 10).

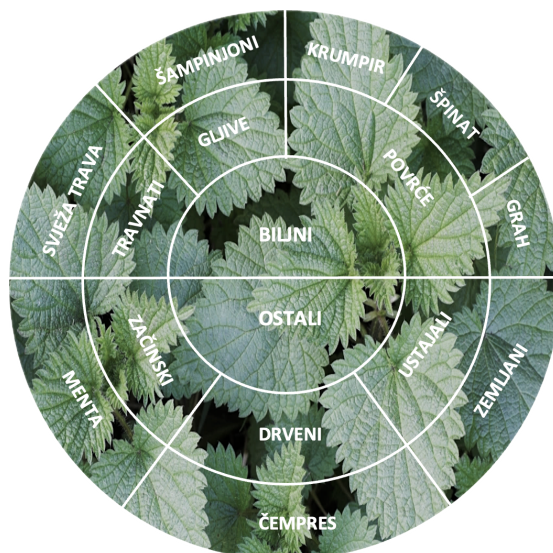




Slika 8. Rezultati senzorske analize biljnih uzoraka



Slika 9. Kotač arome za uzorke ružmarina



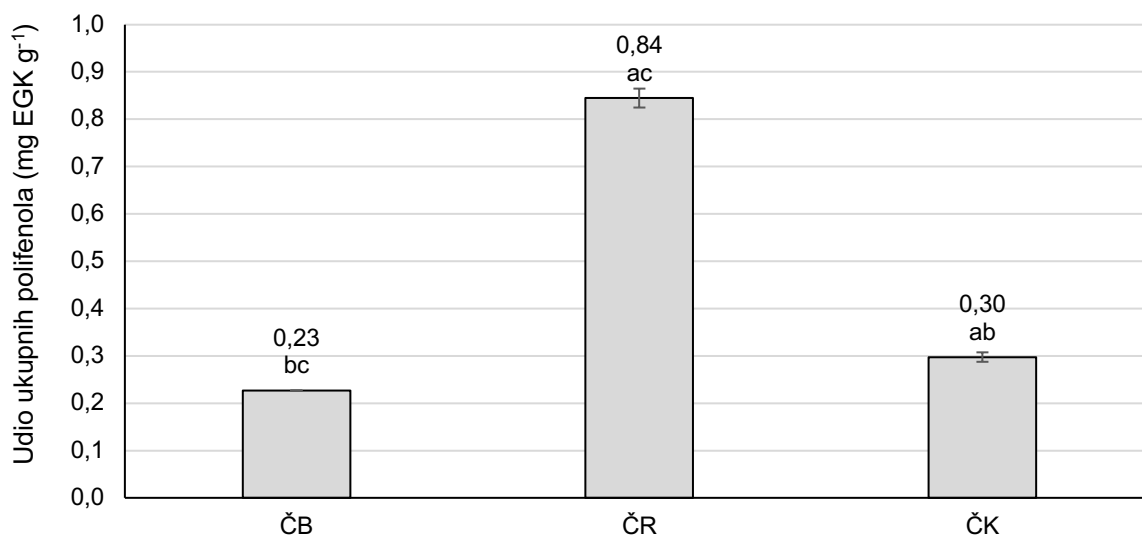
**Slika 10.** Kotač arome za uzorke koprive

Najsnažniji intenzitet mirisa (7,4) određen je u ekstraktu HR te nešto niži u ekstraktima KR (6,2) i HK (6,2), dok je najslabiji intenzitet mirisa određen u ekstraktu KK (4,6). Oba uzorka ružmarina imala su znatno izraženiju gorčinu (HR=5,8; KR=6) od uzoraka koprive (HK=1,6; KK=1,4). Trpkost je također bila izraženija kod uzoraka ružmarina (KR,HR=2,6), dok je kod oba uzorka koprive ista bila vrlo slabo izražena (HK=1; KK=1,2). Svi uzorci pokazali su izrazito slabu slatkoću te su prosječne ocjene tog parametra za sve uzorke bile u rasponu od 1 do 2. Uzorci ružmarina bili su aromatičniji (KR=5,4; HR=5,2), u odnosu na uzorke koprive (HK=4,6; KK=3,6). Uzorci s najvećom prihvatljivošću bili su hrvatska kopriva (6,8) i kineski ružmarin (5,6), zatim hrvatski ružmarin (4,8), a na posljetku kineska kopriva (4,2).

Prema deskriptivnoj analizi napravljeni su kotači arome za ružmarin (Slika 9) i koprivu (Slika 10). U uzorcima ružmarina uočene su cvjetne, slatke, voćne, pržene i biljne arome, a posebno su se istaknule drvene, travnate, začinske arome ali i aroma jasmína i meda. Kod kopriva su se najviše isticala biljne arome povrća (špinat, krumpir, grah) i travnate arome. Od ostalih aroma, panelisti su zamijetili zemljano, čempres i mentu.

#### 4.7. Bioaktivni sastav novoformuliranih čokolada

Uzimajući u obzir bioaktivni i senzorski profil ekstrakata, za formulaciju čokolada izabrani su ekstrakti kineskog ružmarina i hrvatske koprive. Obogaćenim čokoladama određen je udio ukupnih i pojedinačnih polifenola te antioksidacijski kapacitet. Rezultati su prikazani na Slici 11 i Tablicama 6 i 7.



**Slika 11.** Udio ukupnih polifenola u čokoladama

EGK-ekvivalenti galne kiseline; a-statistički značajna razlika u odnosu na ČB ( $p < 0,05$ ); b-statistički značajna razlika u odnosu na ČR ( $p < 0,05$ ); c-statistički značajna razlika u odnosu na ČK ( $p < 0,05$ ). Statistička obrada rezultata provedena je koristeći jednosmjerni ANOVA test i Tukey *post-hoc* test.

**Tablica 6.** Udio pojedinačnih polifenolnih spojeva čokolada

Uzorak	Ružmarinska kiselina (mg g <sup>-1</sup> )	Kafeinska kiselina (mg g <sup>-1</sup> )	Rutin (mg g <sup>-1</sup> )	Kafeoil maleinska kiselina (mg g <sup>-1</sup> )
ČR	0,34	0,01	0,04	/
ČK	/	/	/	0,05

**Tablica 7.** Antioksidacijski kapacitet čokolada

Uzorak	ABTS (μmol Trolox g <sup>-1</sup> )	DPPH (μmol Trolox g <sup>-1</sup> )
ČB	22,04 ± 0,19 <sup>bc</sup>	23,75 ± 2,1 <sup>bc</sup>
ČR	63,74 ± 1,5 <sup>ac</sup>	62,90 ± 0,4 <sup>ac</sup>
ČK	41,29 ± 0,7 <sup>ab</sup>	38,11 ± 1,5 <sup>ab</sup>

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

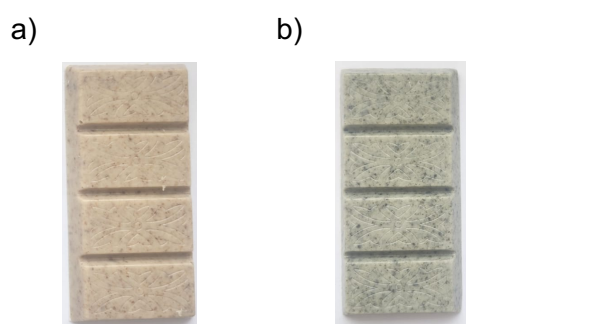
Dodatak ekstrakata ružmarina i koprive rezultirao je statistički značajnim ( $p < 0,05$ ) povećanjem udjela ukupnih polifenola u čokoladama. Najveći udio ukupnih polifenola (0,84 mg EGK g<sup>-1</sup>) određen je u čokoladi s dodatkom ružmarina, dok je u čokoladi s dodatkom koprive isti iznosio 0,30 mg EGK g<sup>-1</sup>. U čokoladi s dodatkom ružmarina identificirani su isti polifenolni spojevi kao i u njegovom ekstraktu - najveći udio zabilježen je za ružmarinsku kiselinu (0,34 mg g<sup>-1</sup>), zatim za rutin (0,04 mg g<sup>-1</sup>) te za kafeinsku kiselinu (0,01 mg g<sup>-1</sup>), dok je u čokoladi s dodatkom

koprive, kao i u slučaju njezinog ekstrakta, identificirana samo kafeoil maleinska kiselina ( $0,05 \text{ mg g}^{-1}$ ). Čokolada s dodatkom ružmarina imala je veći i raznovrsniji profil polifenolnih spojeva što je u skladu s rezultatima određivanja antioksidacijskog kapaciteta. Najveći antioksidacijski kapacitet, primjenom obje metode, tako karakterizira čokoladu s dodatkom ružmarina ( $63,74$  i  $62,90 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ).

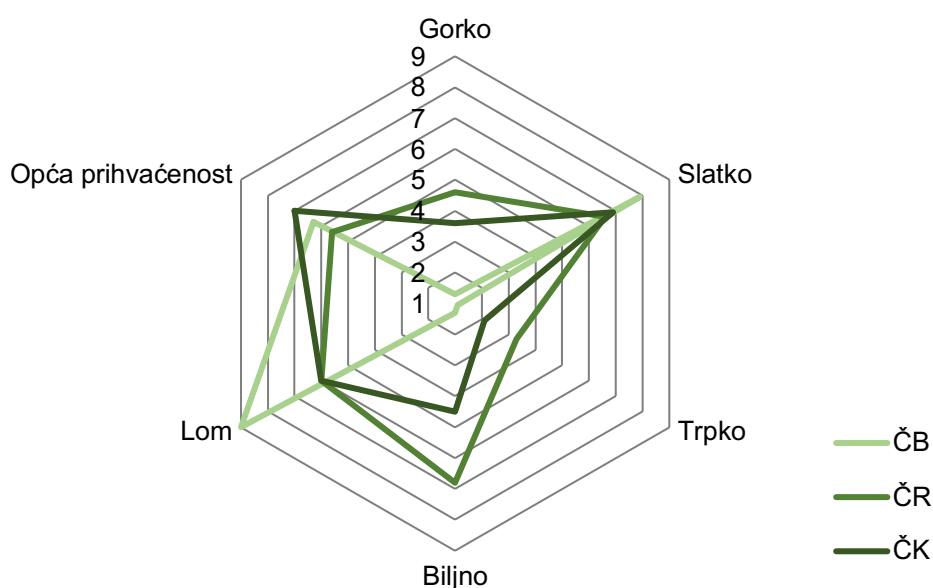
Poliński i sur. [50] formulirali su bijelu čokoladu s dodatkom 2 % matcha praha i moringe. DPPH metodom izmjeren je njihov antioksidacijski kapacitet te je za čokoladu s dodatkom matcha praha isti iznosio  $53,7 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ , a za čokoladu s dodatkom praha moringe  $7,5 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ . ABTS metodom određeno je  $74,9 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  za čokoladu s matcha prahom, a za čokoladu s dodatkom moringe  $9,3 \text{ } \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ .

#### 4.8. Senzorska analiza čokolada

Na Slici 12 prikazana je fotografija novoformuliranih čokolada, a rezultati senzorske analize prikazani su na Slici 13.



**Slika 12.** Čokolada s dodatkom ekstrakta ružmarina (a) i ekstrakta koprive (b)



**Slika 13.** Rezultati senzorske analize čokolada

Slatki okus bio je najizraženiji u kontrolnom uzorku ČB (7,9) dok je dodatak ružmarina i koprive rezultirao smanjenjem slatkoće (ČR=6,6; ČK=6,9). Dodatak ružmarina u bijelu čokoladu rezultirao je povećanjem gorčine (3,6) i trpkosti (3,3) dok su ta svojstva bila manje izražena dodatkom koprive (gorčina=3,6; trpkost=2,1). Panelisti su osjetili najizraženiji biljni okus kod ČR (6,8), a kod ČK on je bio slabijeg intenziteta (4,5). Intenzitet loma se kod obje čokolade s biljnim dodatkom smanjio te je dobio ocjenu 6. Čokolada s dodatkom koprive imala je najbolju opću prihvatljivost (7), sljedeća je bila bijela čokolada bez biljnih dodataka (6,3), a naposljetku čokolada s dodatkom ružmarina (5,6).

Poliński i sur. [49] napravili su bijele čokolade s dodatkom matcha praha i praha moringe te je provedena senzorska analiza i čokolada s dodatkom moringa praha bila je bolje ocjenjena (4,74/5). Čokolada s moringa prahom opisana je s iznimno poželjnim karakteristikama, a i sladak i mliječni okus bili su izraženiji kod te čokolade, što upućuje na to da je matcha prah bio okusom preintenzivan i maskirao okus čokolade. Panelisti nisu zabilježili prisutnost nepoželjnih aroma, a čokolada s dodatkom matcha praha imala je ujednačeniju boju.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet hrvatskog i kineskog ružmarina nije bio statistički značajno različit, dok su kod uzoraka koprive uočene veće razlike, pri čemu je hrvatska kopriva imala viši udio ukupnih polifenola i veći antioksidacijski kapacitet.
2. Ekstrakt hrvatske koprive ocijenjen je kao senzorski prihvatljiviji u odnosu na ekstrakt kineske koprive, dok je ekstrakt kineskog ružmarina bio senzorski prihvatljiviji od hrvatskog ružmarina.
3. Dodatak ekstrakta ružmarina u bijelu čokoladu rezultirao je većim udjelom i raznovrsnijim profilom polifenolnih spojeva, kao i većim antioksidacijskim kapacitetom, u odnosu na kontrolni uzorak, ali je čokolada s dodatkom ekstrakta koprive bila senzorski bolje prihvaćena.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Rasool Hassan BA (2012) Medicinal plants (importance and uses). *Pharmaceut Anal Acta* **3**, e139. doi: 10.4172/2153-2435.1000e139.
2. Phillipson JD (2001) Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* **56** (3), 237-43. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00456-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00456-8)
3. Fitzgerald M, Heinrich M, Booker A (2020) Medicinal Plant Analysis: A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques. *Front Pharmacol* **10**, 1480. doi: 10.3389/fphar.2019.01480
4. Hu Y, Scherngell T, Man SN, Wang Y (2013) Is the United States still dominant in the global pharmaceutical innovation network? *PloS One* **8** (11), e77247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077247>
5. Tilburt JC, Kaptchuk TJ (2008) Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. *Bull World Health Organ* **86** (8), 594-9. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.07.042820>
6. Ganesan A (2008) The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **12** (3), 306-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.016>
7. Jan KN, Zarafshan K, Singh S (2017) Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.): A Reservoir of Nutrition and Bioactive Components with Great Functional Potential. *J Food Meas Charact* **11**, 423–433. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9410-4>
8. Petruzzello M (2022) Stinging nettle plant. <https://www.britannica.com/plant/stingin-g-nettle>.
9. Said AAH, Otmani ISE, Derfoufi S, Benmoussa A (2015) Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int J Pharm Pharmaceut Sci* **7** **10**, 8–14. <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijpps/article/view/8165>.
10. Upton R (2013) Stinging Nettles Leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary Vegetable Medicine. *J. Herb. Med.* **3**, 9–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>
11. Anonymous 1 (2024) <https://www.alamy.com/stock-photo/nettle-illustration.html?sortBy=relevant> Pristupljeno 10. srpnja 2024.
12. Kořzegi K, Békássy-Molnár E, Koczka N, Kerner T, Stefanovits-Bányai É (2020) Changes in Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) from Spring to Autumn. *Period Polytech Chem Eng* **64**, 548–554. <http://dx.doi.org/10.3311/PPch.14338>
13. Otles S, Yalcin B (2012) Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *Sci World J* <https://doi.org/10.1100/2012%2F564367>

14. Đurović S, Pavlić B, Šorgić S, Popov S, Savić S, Pertonijević M, Radojković M, Cveta-nović A, Zeković Z (2017) Chemical Composition of Stinging Nettle Leaves Obtained by Different Analytical Approaches. *J Funct Foods* **32**, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.019>
15. Orčić D, Francišković M, Bekvalac K, Svirčev E, Beara I, Lesjak M, Mimica-Dukić N (2014) Quantitative Determination of Plant Phenolics in *Urtica dioica* Extracts by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometric De-tection. *Food Chem* **143**, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.097>
16. Grauso L, Emrick S, Bonanomi G, Lanzotti V (2019) Metabolomics of the Alimurgic Plants Taraxacum Officinale, Papaver Rhoeas and *Urtica dioica* by Combined NMR and GC–MS Analysis. *Phytochem Anal* **30**, 535–546. <https://doi.org/10.1002/pca.2845>
17. Guil-Guerrero JL, Reboloso-Fuentes MM, Torija Isasa ME (2003) Fatty Acids and Ca-rotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Food Compos Anal* **16**, 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(02\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00172-2)
18. Khare V, Kushwaha P, Verma S, Gupta A, Srivastava S, Rawat A (2012) Pharmacog-nostic Evaluation and Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L. *Chin Med* **3**, 128–135. <http://dx.doi.org/10.4236/cm.2012.33021>
19. Roschek B, Fink RC, McMichael M, Alberte RS (2009) Nettle Extract (*Urtica dioica*) Affects Key Receptors and Enzymes Associated with Allergic Rhinitis. *Phytother Res* **23**, 920–926. <https://doi.org/10.1002/ptr.2763>
20. Ghaima KK, Hashim NM, Ali SA (2013) Antibacterial and Antioxidant Activities of Ethyl Acetate Extract of Nettle (*Urtica dioica*) and Dandelion (Taraxacum Officinale). *J Appl Pharm Sci* **3**, 96–99. <https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2013.3518>
21. Bnouham M, Merhfour FZ, Ziyat A, Mekhfi H, Aziz M, Legssyer A (2003) Antihyper-glycemic Activity of the Aqueous Extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia* **74**, 677–681. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00182-5)
22. Morales R (2010) *Flora Ibérica*; CSIC: Madrid, Spain **12**, 321–327.
23. Nicholson PT (2000) *Ancient Egyptian Materials and Technology*; Cambridge Univer-sity Press **175**. <http://dx.doi.org/10.2307/507283>
24. Al-Sereitia M, Abu-Amerb K, Sena P (1999) Pharmacology of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and Its Therapeutic Potentials. *Ind J Exp Biol* **37**, 124–131. PMID: 10641130
25. Heinrich M, Kufer J, Leonti M, Pardo-de-Santayana M (2006) Ethnobotany and eth-nopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *J. Ethnopharmacol* **107**, 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.035>

26. Anonymous 2 (2024) <https://www.alamy.com/stock-photo/rosmarinus-officinalis-illustration.html?sortBy=relevant> Pristupljeno 10. srpnja 2024.
27. Andrade JM, Faustino C, García C, Ladeiras, D, Reis CP, Rijo P (2018) *Rosmarinus officinalis* L.: An update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Sci OA* **4**, 283. <https://doi.org/10.4155/foa-2017-0124>
28. Klančnik A, Guzej B, Kolar MH, Abramović H, Možina SS (2009) In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *J Food Prot* **72** (8), 1744–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1744>
29. Beretta G, Artali R, Facino RM, Gelmini F (2011) An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: the case of *Rosmarinus officinalis* L. *J Pharm Biomed Anal* **55** (5), 1255–1264 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.026>
30. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR (2016) Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 1-21. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
31. Shin H-B, Choi M-S, Ryu B (2013) Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virol. J.* **10** (1), 303. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-303>
32. Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A (2008) Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *J Med Food* **11** (4), 741–746 <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0524>
33. Lucarini R, Bernardes WA, Ferreira DS (2013) In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharm Biol* **51** (9), 1087–1090. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.776613>
34. Senanayake SN (2018) Rosemary extract as a natural source of bioactive compounds. *Journal of Food Bioactives* **2** (2), 51–57. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.2140>
35. Cedeño-Pinos C, Martínez-Tomé M, Murcia MA, Jordán MJ, Bañón S (2020). Assessment of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract as Antioxidant in Jelly Candies Made with Fructan Fibres and Stevia. *Antioxidants* **9**, 1289. <https://doi.org/10.3390/antiox9121289>
36. Krawęcka A, Sobota A, Pankiewicz U, Zielińska E, Zarzycki P (2021) Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) as a Functional Component in Durum Wheat Pasta Production: Impact on Chemical Composition, In Vitro Glycemic Index, and Quality Properties. *Molecules* **26** (22), 6909. <https://doi.org/10.3390/molecules26226909>

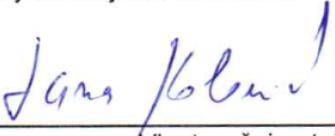


37. Anonymous 3 (2024) <https://wildwoodchocolate.com/products/rosemary-collection-box> Pristupljeno 10. srpnja 2024.
38. Anonymous 4 (2024) <https://www.biolaboratorium.com/en/products/brennesselbons-50g-reutter> Pristupljeno 10. srpnja 2024.
39. Padmore JM (1990a) Animal feed - AOAC official method 930.15 - Moisture in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, Vol **1**, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC *International*, VA, 69-70.
40. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144-158. doi: 10.12691/jfnr-5-4-5
41. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
42. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
43. Huang Y, Sheng J, Yang F, Hu Q (2007) Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *Journal of food Engineering* **78**, 687-692. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.007>
44. ISO 8589:2007, Sensory analysis – General guidelines for the design of test rooms.
45. Al-jaafreh AM (2024) Evaluation of Antioxidant Activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil and Different Types of Solvent Extractions. *Biomed Pharmacol J* **17** (1). <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2860>
46. Faller ALK, Fialho E (2009) The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking, *Food Research International* **42**, 1, 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.10.009>
47. Li P, Liu A, Li Y, Yuan B, Xiao W, Liu Z i sur. (2019) Development and Validation of an Analytical Method Based on HPLC-ELSD for the Simultaneous Determination of Rosmarinic Acid, Carnosol, Carnosic Acid, Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Rosemary. *Molecules* **24**, 323. <https://doi.org/10.3390/molecules24020323>
48. Vajić U, Grujić-Milanović J, Živković J, Šavikin K, Gođevac D, Miloradović Z i sur. (2015) Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology, *Ind Crops Prod* **74**, 912-917. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.032>

49. Repajić M, Cegledi E, Zorić Z, Pedisić S, Elez Garofulić I, Radman S i sur. (2021) Bioactive Compounds in Wild Nettle (*Urtica dioica* L.) Leaves and Stalks: Polyphenols and Pigments upon Seasonal and Habitat Variations. *Foods* **10**, 190. <https://doi.org/10.3390/foods10010190>
50. Poliński S, Topka P, Tańska M, Kowalska S, Czaplicki S, Szydłowska-Czerniak A (2022) Impact of Bioactive Compounds of Plant Leaf Powders in White Chocolate Production: Changes in Antioxidant Properties during the Technological Processes. *Antioxidants* **11**, 752. <https://doi.org/10.3390/antiox11040752>

### Izjava o izvornosti

Ja Lana Kolonić 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.

  
Vlastoručni potpis