

# Usporedba bioraspoloživosti aktivnih tvari iz tekućih i mikroinkapsuliranih ekstrakata ljekovitog mediteranskog bilja

---

Sarić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:050594>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2020. godina

Ivana Sarić

1042/N

**USPOREDBA  
BIORASPOLOŽIVOSTI  
AKTIVNIH TVARI IZ TEKUĆIH I  
MIKROINKAPSULIRANIH  
EKSTRAKATA LJEKOVITOG  
MEDITERANSKOG BILJA**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Benković, uz pomoć doc.dr.sc. Davora Valingera iz Laboratorija za mjerenja, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Neizmjerno se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Maji Benković na iskazanome strpljenju, savjetima i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada, kao i doc.dr.sc. Davoru Valingeru i doc.dr.sc. Ani Jurinjak Tušek na pomoći tijekom provedbe istraživanja. Veliko hvala mojoj obitelji, posebno baki i djedu, na pruženom razumijevanju i podršci tijekom cijelog mog školovanja. Zahvaljujem se i dragim prijateljima iz Cvjetnog naselja i SVK Split koji su me motivirali i pratili na ovome putu.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### USPOREDBA BIORASPOLOŽIVOSTI AKTIVNIH TVARI IZ TEKUĆIH I MIKROINKAPSULIRANIH EKSTRAKATA LJEKOVITOG MEDITERANSKOG BILJA

*Ivana Sarić, 1042/N*

**Sažetak:** Mediteranska se dijeta pokazala kao jedna od najuspješnijih u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Osim primjene maslinova ulja u prehrani, njena je posebnost i u upotrebi ljekovitog bilja u obliku začina ili čaja. Stoga su, u okviru ovog rada, ispitana svojstva pet biljnih uzoraka karakterističnih za mediteransko podneblje: matičnjaka, metvice, majčine dušice, kadulje i lavande. Ekstrakcijom pomoću vode te adsorpcijom na alginat dobiveni su tekući, odnosno mikroinkapsulirani ekstrakti. Proizvedenim ekstraktima određivana su fizikalna (pH, ukupne otopljene tvari, vodljivost, suha tvar) i kemijska svojstva (udio polifenola i antioksidacijska aktivnost). Kod obje se vrste ekstrakta (tekućeg i inkapsuliranog) matičnjak pokazao kao uzorak s najvišom koncentracijom polifenola te, prema DPPH i FRAP metodi, najvećom antioksidacijskom aktivnosti. Najmanje vrijednosti za navedene parametre imali su ekstrakti lavande. Analizom otpuštanja bioaktivnih tvari iz mikrokapsula utvrđeno je da se najveća količina bioaktivnih tvari otpustila iz mikrokapsula matičnjaka. Analizom kemijskih svojstava ekstrakata nakon *in vitro* probave, utvrđen je znatan pad koncentracije polifenola i antioksidacijske aktivnosti kod tekućih uzoraka, dok su mikroinkapsulirani ekstrakti pokazali veći stupanj očuvanja.

**Ključne riječi:** mediteransko bilje, mikroinkapsulacija, polifenoli, antioksidacijska aktivnost, *in vitro* probava

**Rad sadrži:** 53 stranice, 11 slika, 9 tablica, 55 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc.dr.sc. Maja Benković

**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. Davor Valinger

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
2. Doc.dr.sc. Maja Benković
3. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
4. Izv.prof.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjena)

**Datum obrane:** 17. srpnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Process Engineering  
Section for Fundamental Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

### COMPARISON OF BIOAVAILABILITY OF ACTIVE SUBSTANCES FROM LIQUID AND MICROENCAPSULATED EXTRACTS OF MEDICINAL MEDITERRANEAN HERBS

*Ivana Sarić, 1064/N*

**Abstract:** The Mediterranean diet has proven to be among the most efficient ones in preventing cardiovascular diseases. In addition to the use of olive oil in the diet, its distinguishing trait is the use of medicinal herbs in form of spices or tea. Therefore, this paper examines the properties of five Mediterranean plant samples: lemon balm, mint, thyme, sage and lavender. Liquid and encapsulated extracts had been prepared by extraction with water and adsorption by alginate. Physical (pH, total dissolved solids, conductivity, dry matter) and chemical properties (TPC and antioxidant activity) were then determined for the produced extracts. Within both types of extract (liquid and microencapsulated), lemon balm proved to be the sample with the highest concentration of polyphenols and, according to the DPPH and FRAP methods, the one with the highest antioxidant activity. The lowest values for the stated parameters were shown by the lavender samples. Similar results were obtained by the release test, where the release of active substances from microcapsules was observed. Chemical analysis of the extracts after *in vitro* digestion revealed a significant decrease in polyphenol concentration and antioxidant activity in liquid samples, while microencapsulated extracts showed a higher survival rate.

**Keywords:** Mediterranean plants, polyphenols, microencapsulation, antioxidant activity, *in vitro* digestion

**Thesis contains:** 53 pages, 11 figures, 9 tables, 55 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Maja Benković, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Davor Valinger, Assistant professor*

**Reviewers:**

1. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
3. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
4. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 17 July 2020

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. <i>Lamiaceae</i> (USNATICE) .....	2
2.1.1. Matičnjak.....	2
2.1.2. Paprena metvica (menta) .....	3
2.1.3. Majčina dušica.....	3
2.1.4. Kadulja .....	4
2.1.5. Lavanda .....	4
2.2. VAŽNOST ANTIOKSIDANSA .....	5
2.3. POLIFENOLI .....	5
2.3.1. Općenito o polifenolima .....	5
2.3.2. Probava i metabolizam .....	6
2.3.2.1. Usna šupljina.....	6
2.3.2.2. Želudac.....	7
2.3.2.3. Tanko crijevo .....	7
2.3.2.4. Debelo crijevo .....	7
2.3.3. Antimikrobna i antioksidativna aktivnost.....	8
2.3.4. Interakcije s drugim komponentama hrane.....	8
2.4. <i>In vitro</i> METODE PROCJENE BIORASPOLOŽIVOSTI SASTOJAKA HRANE .....	9
2.5. MIKROINKAPSULACIJA KAO METODA ZAŠTITE FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA BIOAKTIVNIH SPOJEVA.....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Aparatura i pribor .....	12
3.1.2. Reagensi .....	13
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Proizvodnja tekućih biljnih ekstrakta .....	15
3.2.2. Postupak pripreme mikrokapsula .....	15
3.2.3. Adsorpcija ekstrakata na mikrokapsule .....	15
3.2.4. Analiza fizikalnih svojstava ekstrakata i mikrokapsula.....	16
3.2.4.1. Vodljivost i TDS .....	16
3.2.4.2. Suha tvar .....	16
3.2.4.3. Analiza veličine i izgleda mikrokapsula .....	16
3.2.5. Kemijske analize .....	17
3.2.5.1. Priprema mikrokapsula za kemijske analize .....	17
3.2.5.2. Određivanje ukupnih polifenola (TPC).....	17
3.2.5.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	18
3.2.5.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	19
3.2.6. Kinetika otpuštanja aktivnih tvari iz mikrokapsula .....	20
3.2.7. <i>In vitro</i> simulacija probavnog sustava .....	21



3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
4.1. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA.....	24
4.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata prije adsorpcije .....	24
4.1.2. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata nakon adsorpcije.....	27
4.2. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA MIKROKAPSULA.....	30
4.2.1. Fizikalna svojstva mikrokapsula .....	30
4.2.2. Kemijska svojstva mikrokapsula .....	33
4.3. OTPUŠTANJE AKTIVNIH TVARI IZ MIKROKAPSULA.....	35
4.4. USPOREDBA <i>in vitro</i> PROCESA PROBAVE ČISTIH EKSTRAKATA I MIKROKAPSULA.....	41
4.4.1. Kemijska svojstva tekućih i mikroinkapsuliranih biljnih ekstrakata nakon simulacije probave .....	41
4.4.2. Postotak preživljavanja spojeva s antioksidacijskom aktivnošću .....	44
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>48</b>

# 1. UVOD

Početak 21. stoljeća razvijenim je zemljama svijeta donio brojne pozitivne promjene u svakodnevnom odvijanju života, ali i povećanje prevalencije oboljelih od kroničnih bolesti. Zapadnjački stil prehrane, zapostavljanje tjelesne aktivnosti i manjak sna, čimbenici su koji su bitno utjecali na psihičko i fizičko zdravlje većine ljudi. Dijabetes, rak te bolesti krvožilnog ili živčanog sustava sve više pogađaju i mlađu populaciju. Od navedenih kroničnih oboljenja, najveću stopu smrtnosti imaju kardiovaskularne bolesti. Dugogodišnji statistički podaci pokazuju da, od područja koji žive zapadnjačkim načinom života, najmanju prevalenciju ovih bolesti ima mediteransko podneblje (Mihailovic-Stanojevic i sur., 2013). Stoga ne čudi činjenica da je mediteranska dijeta i dalje među najpopularnijima na svijetu. Svoju učinkovitost u prevenciji kroničnih bolesti zahvaljuje svakodnevnoj primjeni voća, povrća i ljekovitog bilja koji obiluju polifenolima i drugim antioksidansima.

Predmet istraživanja ovog rada je ljekovito bilje s područja Mediterana i to: matičnjak, paprena metvica, majčina dušica, kadulja i lavanda. Navedene biljne vrste pripadaju porodici *Lamiaceae*. Kao dio prehrane, u organizam se najčešće unose u obliku čaja. Većina je njihovih blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje posljedica djelovanja polifenola. Budući da su polifenoli spojevi niske biorasploživosti, posljednjih se godina ispituje mogućnost njihovog unosa u organizam u drugačijem obliku. Stoga je, u okviru ovog eksperimenta, dio ekstrakata čajeva svih navedenih biljnih vrsta mikroinkapsuliran.

Kako bi se utvrdila, a kasnije i usporedila biorasploživost polifenola iz tekućih i mikroinkapsuliranih ekstrakata, bilo je potrebno simulirati probavu. U tu svrhu je korištena *in vitro* metoda, postupak kojim se uzorci izlažu simuliranim uvjetima probavnog sustava te izuzimaju i analiziraju nakon prolaska kroz svaki odjeljak (Minekus i sur., 2014). Rezultati su dobiveni mjerenjem antioksidacijske aktivnosti početnih i izuzetih ekstrakata te su kasnije uspoređeni. Glavni cilj ovog rada je utvrditi oblik u kojem je učinkovitije konzumirati ekstrakte navedenih biljnih vrsta te tako moći dati preporuku svima koji žele implementirati principe mediteranske prehrane u svrhu očuvanja zdravlja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2. 1. *Lamiaceae* (USNATICE)

U ovom je radu kao uzorak korišteno pet vrsta ljekovitog bilja široko rasprostranjenog na mediteranskom području: matičnjak (*Melissa officinalis*), paprena metvica ili menta (*Mentha x piperita*), majčina dušica (*Thymus serpyllum*), kadulja (*Salvia officinalis*) i lavanda (*Lavandula angustifolia*). Sve navedene biljne vrste pripadaju porodici *Lamiaceae* te se često primjenjuju u medicini, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Aprotosoae i sur., 2013). *Lamiaceae* (Usnatice) je naziv porodice aromatičnih zeljastih ili grmolikih biljaka. Stabljika im je četvrtasta, a cvjetna stapka se račva na dvoje pa cvjetovi rastu poput krošnje (Čančarević i sur., 2013). U svojim žlijezdama sintetiziraju eterična ulja, što je uzrok njihove izrazite aromatičnosti. Imaju antibiotsko, antioksidativno i spazmolitičko djelovanje, a koriste se i kao sredstva za ublažavanje nadutosti i poticanje probave (Aprotosoae i sur., 2013). U nastavku su ukratko opisane njihove osnovne karakteristike, primjena, pozitivni učinci na zdravlje čovjeka, ali i moguće nuspojave uslijed pretjerane uporabe.

#### 2.1.1. Matičnjak

Matičnjak (*Melissa officinalis*) je višegodišnja biljka karakterističnog mirisa koji podsjeća na limun. Uzgaja se na području Mediterana, srednje Europe i Azije (Brezovec i sur., 2006). U narodu se primjenjuje još od antičkih vremena, kada su je Grci i Rimljani koristili u terapiji poremećaja živčanog sustava i raspoloženja (Ondrejovič i sur., 2012). Kasnije se ispitivanjima potvrdilo da biljka ima anksiolitičko djelovanje, pa je i danas od koristi osobama koje boluju od anksioznosti i nesаницe. Preporučuje se i pacijentima sa želučanim tegobama, bolovima u donjem dijelu trbuha, visokim tlakom, kroničnim bronhitisom, glavoboljom i zuboboljom. Bogat polifenolima, matičnjak djeluje kao snažan antioksidans pa usporava oksidativnu degradaciju lipida (Ondrejovič i sur., 2012). Od flavonoida su najviše zastupljeni kvercitrin i ramnocitrin te glikozidi luteolina, apigenina i kemferola, a od fenolnih kiselina ružmarinska (Brezovec i sur., 2006). Budući da se pripravci matičnjaka upotrebljavaju već tisućama godina (eterična ulja, čajevi, tinkture, karmelićanska vodica...), a nisu prijavljene značajnije nuspojave, može se reći da je svima siguran za korištenje (Kennedy i sur., 2002).

### 2.1.2. Paprena metvica (menta)

Paprena metvica (*Mentha x piperita*) je zeljasta višegodišnja aromatična biljka. Hibrid je vodene i klasaste metvice koji je s europskog i prostora Bliskog istoka prenesen u ostale dijelove svijeta gdje se uspješno uzgaja. Glavni sastojak njenog eteričnog ulja je mentol, spoj kojem biljka duguje svoju intenzivnu aromu i spazmolitičko djelovanje (Balakrishnan, 2015). Čaj od mente djeluje smirujuće na nadraženo grlo, pomaže kod prehlade, ublažava nadutost i simptome iritabilnog crijeva (Kapp i sur., 2013). Polifenoli prisutni u biljci (eriocitrin, luteolin-7-O-rutinozid, ružmarinska kiselina) su, uz jak antioksidativni učinak, pokazali i visok stupanj inhibicije najčešćih uzročnika mokraćnih, crijevnih i dišnih infekcija (Akroum i sur., 2009). Osim antibiotskog, mentini pripravci imaju i virucidno djelovanje pa uspješno suzbijaju simptome herpesa i gripe. Pretjeranom inhalacijom eteričnog ulja ili koncentrirane vodene infuzije mente mogu se javiti akutni simptomi poput mučnine, ataksije i poremećaja srčanog ritma (Balakrishnan, 2015). Ukoliko se upotrebljavaju u preporučenim količinama, čaj i eterično ulje ne izazivaju nuspojave.

### 2.1.3. Majčina dušica

Majčina dušica (*Thymus serpyllum*) je biljka malog rasta i grmolika oblika, najviše rasprostranjena na Mediteranu, ali karakteristična i za dijelove sjeverne Azije i južne Afrike. Ova aromatična biljka ima diuretsko, analgetsko i antiseptičko djelovanje, a služi i kao sredstvo protiv nadimanja. Često se dodaje u vodice za usta te se koristi za ublažavanje kašlja i prehlade. Snažan je antioksidans i antikancerogen: djeluje citotoksično na stanice raka debelog crijeva, želuca i pluća (Nikolić i sur., 2014). Već dugo se koristi i u kulinarstvu. Njezini pripravci imaju antioksidacijsko djelovanje zahvaljujući ružmarinskoj i kofeinskoj kiselini, kvercetinu, eriocitrinu, luteolinu i drugim polifenolnim spojevima (Nikolić i sur., 2014). Inhibirajući stvaranje konjugiranih diena, ružmarinska kiselina sprječava oksidaciju LDL-a u ljudskom organizmu. Istraživanje iz 2013. godine pokazalo je da čaj od majčine dušice ima antihipertenzivni učinak pa tako i potencijalnu ulogu u tretmanu osoba s povišenim krvnim tlakom (Mihailovic-Stanojevic i sur., 2013). Pripravci od majčine dušice su, u preporučenim količinama, sigurni za upotrebu. Mogu ih konzumirati i djeca, trudnice i dojilje. Međutim, zbog antikoagulirajućeg djelovanja biljke, osobe koje imaju dogovoren operativni zahvat ove bi pripreme trebale izbjegavati najmanje dva tjedna prije operacije (WebMD, 2018).

#### 2.1.4. Kadulja

Kadulja (*Salvia officinalis*) je višegodišnja gromolika biljka okrugla oblika karakteristična za mediteransko i područje Bliskog istoka (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017). U narodnoj medicini se dugo koristi kao sredstvo za pomoć kod vrtoglavice, tremora, napadaja, reume, gihta, ali i ulkusa i dijareje. Pripisuje joj se antimikrobni, antioksidativni, analgetički, hipoglikemički i hipolipemički učinak. Rezultati nekoliko različitih istraživanja pokazali su da ekstrakt kadulje može inhibirati rast stanica raka grla, kože, dojke, debelog crijeva, grlića maternice i gušterače (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017).

Najveću antioksidativnu moć u kadulji imaju karnosol, karnosolna i ružmarinska kiselina. Kada govorimo o uklanjanju slobodnih radikala, učinkovitost karnosola se može usporediti s djelovanjem  $\alpha$ -tokoferola. Novija su istraživanja pokazala da bi ekstrakt kadulje mogao sniziti razinu glukoze u krvi kod zdravih i osoba oboljelih od dijabetesa inhibirajući glukoneogenezu u hepatocitima i smanjujući inzulinsku rezistenciju (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017). Potencijalno toksični spojevi u čaju od kadulje su terpeni, kamfor i tujon. Kod dugotrajne konzumacije mogu izazvati tahikardiju, vrtoglavicu, povraćanje, čak i alergijsku reakciju. Navedeni spojevi mogu biti opasni za nerazvijeni organizam pa se kadulja ne preporučuje trudnicama i dojiljama (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017).

#### 2.1.5. Lavanda

Lavanda (*Lavandula angustifolia*) je zimzeleni polugrm visine do 60 centimetara. Uzgaja se na području Mediterana, sjeverne Afrike te diljem Azije. Čaj i eterično ulje lavande se od davnina koriste za iskašljavanje i opuštanje glatkih mišića (Blažeković i sur., 2010). Imaju antifungalna i antibakterijska svojstva pa učinkovito ublažavaju simptome respiratornih, urinarnih i gastrointestinalnih infekcija (Prusinowska i Śmigielski, 2014). Najuspješnije inhibiraju rast vrsta *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Jianu i sur., 2013). U lavandi su od polifenola najzastupljenije fenolne kiseline, od kojih ružmarinska najviše doprinosi njezinoj antioksidativnoj moći. 2010. godine objavljeni su rezultati eksperimenta u kojem se uspoređivao učinak vrste lavande koja se najčešće koristi u fitoterapiji (*Lavandula angustifolia*) i hrvatske autohtone sorte "Budrovke" (*Lavandula x intermedia*). Utvrđeno je da "Budrovka" ima neznatno niži antioksidacijski potencijal od najpopularnije vrste lavande, upravo zbog nešto nižeg udjela polifenola u sastavu (Blažeković i sur., 2010).

Sve vrste lavande se primarno proizvode za upotrebu u kozmetičkoj industriji i aromaterapiji u obliku eteričnog ulja, a onda i u obliku infuzije za inhalaciju ili konzumaciju čaja. Potencijalno toksični spojevi u lavandi su D-limonen, geraniol, linalol i linalil acetat. Akutno trovanje se očituje pojavom hipersalivacije, ataksije, mišićnih tremora i hipotermije. Može se javiti primjenom eteričnih ulja oralno ili apikalno u obilnim količinama, dok je kod konzumacije čaja vjerojatnost nastanka trovanja daleko manja zbog niže koncentracije navedenih spojeva. Uporaba eteričnog ulja lavande trudnicama se ne preporučuje (Chu i Kemper, 2001).

## 2.2. VAŽNOST ANTIOKSIDANSA

Snažan okidač nastanka patoloških stanja kod čovjeka je oksidativni stres. Može uzrokovati mutacije, oksidativne lezije i oštećenja tkiva. Najčešće je posljedica djelovanja slobodnih kisikovih i dušikovih reaktivnih vrsta (Sevindik i sur., 2017).

Iako su, kada govorimo o izvoru slobodnih radikala, dobro poznati vanjski utjecaji (ionizirajuće zračenje, UV zračenje, dim cigareta, zagađeni zrak), ne treba zanemariti ni one koji se spontano formiraju u organizmu. Potonji nerijetko nastaju kao nusprodukt oksidacijske fosforilacije te brojnih enzimskih i autooksidacijskih reakcija (Sevindik i sur., 2017). Lipidne membrane su najsklonije oksidativnim oštećenjima. Kako bi se spriječila oksidacija lipida, prehrambenim se proizvodima često dodaju sintetski antioksidansi. Najčešće primjenjivani su butil-hidroksianisol (BHA, E320) i butil-hidroksitoluen (BHT, E321). Budući da postoje sumnje o njihovoj potencijalnoj toksičnosti, znanstvenici sve više istražuju prirodne antioksidanse (Sevindik i sur., 2017).

## 2.3. POLIFENOLI

### 2.3.1. Općenito o polifenolima

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u ljekovitom bilju, kavi, čaju, a ponajviše u voću (citrusi, jabuka, bobičasto voće) i povrću (brokula, luk, tikvica) (Tarko i sur., 2009). Obuhvaćaju više od 6000 različitih spojeva. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstenova na koje je vezana najmanje jedna hidroksilna grupa. U prirodi su najzastupljeniji flavonoidi i fenolne kiseline. Flavonoidi dolaze u obliku aglikona, glikozida i metiliranih derivata. Mogu

se podijeliti u nekoliko skupina: flavoni, flavanoni, flavan-3-oli, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini. Kod fenolnih kiselina razlikujemo hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Aprotosoae i sur., 2013).

Kao i druge sekundarne metabolite, biljke polifenole luče u različitim koncentracijama, ovisno o okolišnim uvjetima kojima su izloženi. Tako su, na primjer, biljke koje rastu uz cestu izloženije većem stresu u odnosu na biljke koje rastu u poljima (Sevindik i sur., 2017). Glavni čimbenici koji im utječu na stabilnost su pH, temperatura, svjetlost, njihova struktura i koncentracija, kao i prisutnost šećera, vlakana, proteina i sumporova dioksida (SO<sub>2</sub>) (Hee Jung i sur., 2013).

Udio polifenola u biljci ovisi i o vremenu berbe te načinu procesiranja, a učinak na zdravlje čovjeka o njihovoj bioaktivnosti i bioraspoloživosti (Aprotosoae i sur., 2013). Polifenoli su spojevi niske bioraspoloživosti; od ukupne količine unesene prehranom, u probavnom se traktu apsorbira samo od 1 do 5 %. Slaba je apsorpcija vjerojatno posljedica njihove slabe topljivosti u vodi i slabe stabilnosti u gastrointestinalnom traktu. Ipak, navedeno ne umanjuje njihovu važnost u prevenciji kroničnih bolesti (Chang, 2019).

## 2.3.2. Probava i metabolizam

### 2.3.2.1. Usna šupljina

Većina je flavonoida u biljkama glikozilirana (vezana na šećere) te ih takve unosimo u organizam. Dio glikozida se hidrolizira već u usnoj šupljini djelovanjem enzima β-glukozidaze pa flavonoidi sada u slobodnom obliku nastavljaju put kroz gastrointestinalni sustav (Walle i sur., 2005; Spencer, 2003). Flavan-3-oli se, za razliku od ostalih vrsta flavonoida, u biljkama nalaze u neglikoziliranom obliku pa ne podliježu reakciji koju katalizira navedeni enzim, već se mogu odmah apsorbirati pasivnom difuzijom. Primjer su epigalokatehin i epigalokatehin galat, fenolni spojevi visoko zastupljeni u zelenom čaju. Potonji se, zajedno uz kvercetin i genistein (aglikoni nastali hidrolizom flavonoidnih glikozida), pokazao učinkovitim inhibitorom umnožavanja stanica raka usne šupljine (Morović, 2018). Ovaj je utjecaj uočen provođenjem *in vitro* studija te predstavlja prvo pozitivno djelovanje metabolizma polifenola na zdravlje čovjeka.

#### 2.3.2.2. Želudac

Uspoređivanjem dosadašnjih *in vitro* i *in vivo* studija kojima je predmet istraživanja bio metabolizam polifenola, došlo je do oprečnih zaključaka o utjecaju niskog pH želuca na strukturu ovih spojeva. Naime, prema eksperimentima provedenim *in vivo*, ne dolazi do cijepanja flavonoidnih oligomera i polimera, dok se u *in vitro* studijama zaključilo suprotno (Morović, 2018). Stoga se utjecaj želučanog medija na polifenole zasad ne može precizno odrediti.

#### 2.3.2.3. Tanko crijevo

Apsorpcija bilo kojeg spoja uvjetovana je njegovom veličinom, topljivošću u vodi i lipidima, vremenom zadržavanja u želucu i crijevima, pH vrijednošću lumena te permeabilnošću enterocita (Spencer, 2003). Dospijevanjem u tanko crijevo, preostali glikozidi se hidroliziraju te su sada flavonoidi dostupni za apsorpciju (Morović, 2018). *In vitro* studije su zabilježile odvijanje metabolizma polifenola i u enterocitima, prije nego preko bazolateralne membrane prođu u krv (Spencer, 2003). Dalje se u jetri odvijaju reakcije biotransformacije (oksidacije, redukcije i hidroksilacije) pomoću enzimskog sustava citokrom P450 (Morović, 2018). Većina fenolnih kiselina se razgrađuje i apsorbira u obliku aglikona već u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava, pa ne podliježe opisanom crijevnom metabolizmu (Thuengtung i Ogawa, 2019).

#### 2.3.2.4. Debelo crijevo

Zbog slabe apsorpcije, većina flavonoida unesenih prehranom dolazi do debelog crijeva gdje je podložna djelovanju crijevnih bakterija. Bakterijski enzimi kataliziraju dekarboksilaciju, dehidroksilaciju te cijepanje aromatskog prstena, pretvarajući tako flavonoide u jednostavnije molekule. Navedeno je potvrđeno studijom gdje se ekstrahiralo samo 3.1 % ingestiranog katehina iz fecesa štakora (Spencer, 2003). Iako crijevne bakterije ovako smanjuju količinu vrijednih antioksidansa dostupnih za apsorpciju, moguće je da razgradni produkti flavonoida u kolonu imaju prebiotičko djelovanje i tako pozitivno utječu na zdravlje crijevne mikroflore (Spencer, 2003). Ipak, za potvrdu ovog učinka su potrebna daljnja istraživanja.



### 2.3.3. Antimikrobna i antioksidativna aktivnost

Budući da se uslijed česte primjene antibiotika kod brojnih pojedinaca stvara rezistencija, sve se više istražuju prirodni spojevi koji mogu inhibirati negativno djelovanje patogena. Antibakterijsku aktivnost flavonoidi zahvaljuju svojim hidroksilnim skupinama. Naime, preko njih ostvaruju nekovalentne veze s molekulama vode unutar bakterijskih stanica te tako inhibiraju odvijanje njihovog metabolizma. Osim toga, imaju sposobnost djelovanja na strukturu proteina: koaguliraju i tako inaktiviraju enzime koje su bakterijama nužni za rast. Ispitivanjima je utvrđeno da je inhibitorno djelovanje biljnih ekstrakata izraženije kod gram-pozitivnih, nego kod gram-negativnih bakterija (Čančarević i sur., 2013).

Zahvaljujući kemijskoj strukturi, polifenoli imaju sposobnost doniranja elektrona ili atoma vodika nestabilnim molekulama s nesparenim elektronom. Tako svoju antioksidativnu aktivnost ispoljavaju uklanjanjem slobodnih radikala, keliranjem prijelaznih metala te djelovanjem na signalne stanične putove i ekspresiju gena (Hee Jung i sur., 2013).

### 2.3.4. Interakcije s drugim komponentama hrane

Tijekom probave, ali i tijekom same proizvodnje i procesiranja hrane, polifenoli ostvaruju nekovalentne (reverzibilne) i kovalentne (uglavnom ireverzibilne) veze s proteinima. Nastanak interakcije ovisi o pH i temperaturi medija, broju hidroksilnih grupa, tipu bočnog lanca i molekularnoj masi polifenola, ali i o vrsti proteina (Ozidal i sur., 2019). Interakcija s polifenolima proteinima može smanjiti topljivost, a time i njihovu probavljivost i funkcionalnost. Isto tako, proteini mogu smanjiti antioksidacijski potencijal polifenola, što je eksperimentalno dokazano na primjeru interakcije polifenola iz crnog čaja s  $\beta$ -kazeinom iz mlijeka (Ozidal i sur., 2019). Imajući na umu ovu, ali i druge neželjene interakcije među komponentama hrane, prehrambeni tehnolozi razvijaju tehnike kojima se interakcija može izbjeći, ili barem vremenski skratiti (Ogawa i sur., 2018).

## 2.4. *In vitro* METODE PROCJENE BIORASPOLOŽIVOSTI SASTOJAKA HRANE

Najtočniju procjenu bioraspoloživosti određene komponente hrane daju ispitivanja na životinjama i ljudima, takozvane *in vivo* studije (Ogawa i sur., 2018). Ove su studije dugotrajne, zahtijevaju velika financijska ulaganja i etički su upitne pa se sve više pribjegava primjeni simuliranog probavnog sustava u laboratoriju, brzim i jednostavnim *in vitro* metodama. Mogućnost paralelnog testiranja više različitih uzoraka razlog je sve učestalije primjene ove metode u znanstvenim istraživanjima diljem svijeta (Hur i sur., 2011). Razvijen je statički i dinamički model simuliranog probavnog sustava, pri čemu potonji, zbog uključivanja motiliteta sustava u provođenje eksperimenta, ima veću preciznost. Kod statičkog je, pak, nemoguće osigurati postepenu oscilaciju pH vrijednosti i koncentracije enzima kroz gastrointestinalni sustav, kao ni uklanjanje produkata probave (Minekus i sur., 2014).

Zbog fiziološke kompleksnosti probavnog sustava, rezultati dobiveni ovim metodama nikada neće biti precizni kao oni dobiveni provođenjem *in vivo* studija, ali se na području biotehnologije stalno radi na njihovom poboljšanju. Tako se enzimi (amilaze, proteaze i lipaze) odabiru prema kemijskim svojstvima ispitivane komponente, a vrijeme inkubacije određuje prema veličini čestica (Hur i sur., 2011). Jedan od znanstvenih ciljeva u sklopu unaprjeđivanja *in vitro* metode je otkrivanje odgovarajućih koncentracija probavnih enzima primjenjivih za ekstrapolaciju rezultata na različite dobne skupine (na primjer, dojenčad i starije osobe) (Minekus i sur., 2014).

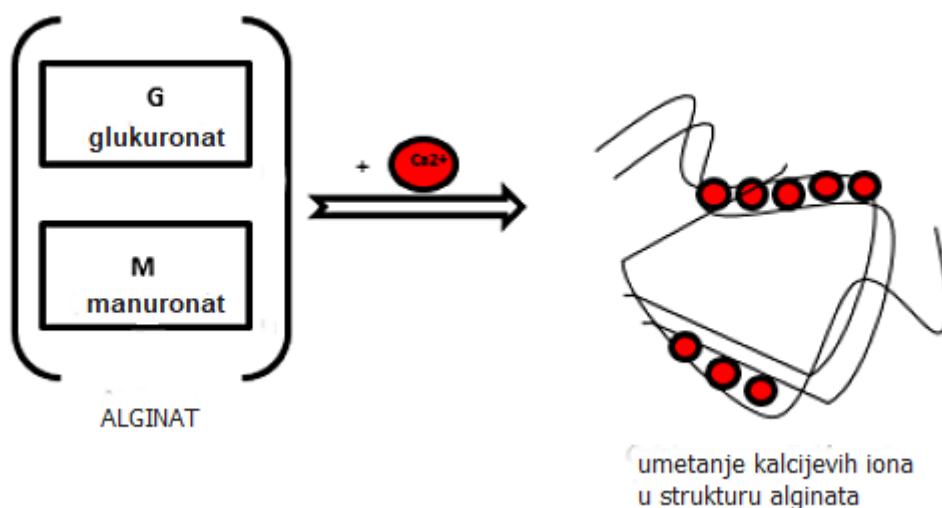
## 2.5. MIKROINKAPSULACIJA KAO METODA ZAŠTITE FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Mikroinkapsulacija podrazumijeva pakiranje aktivnog sastojka unutar kapsule promjera od jednog mikrometra do nekoliko milimetara. Kapsula štiti sastojak od utjecaja okoliša (pH, probavni enzimi) do trenutka pogodnog za njegovo otpuštanje putem difuzije, otapanja ili puknuća kapsule (Bansode i sur., 2010). Sam postupak mikroinkapsulacije primjenjuje različite tehnološke procese: sušenje raspršivanjem, ekstruziju, koacervaciju, kokristalizaciju, stvaranje mikrokapsula kompleksom citodekstrina, mikroinkapsuliranje fluidiziranih čestica, ekspanziju superkritičnih tekućina te kapanje (Stazić, 2019).

Mikroinkapsulacija se provodi zbog:

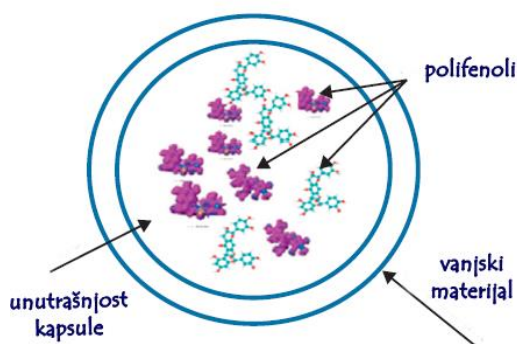
- maskiranja okusa lijekova (potiče prestanak pružanja otpora kod brojnih pacijenata)
- stabiliziranja sastojaka osjetljivih na kisik, svjetlost ili vlagu
- sprječavanja isparavanja aktivnog sastojka
- sprječavanja nepoželjnih interakcija među različitim sastojcima
- smanjivanja toksičnosti i iritacije probavnog sustava uzrokovanog sastavom primijenjenog lijeka ili hrane
- poticanja odgođenog ili produženog djelovanja aktivnog sastojka
- izmjene mjesta apsorpcije sastojka (Bansode i sur., 2010).

Materijal koji obavlja aktivnu tvar mora biti nepropustan, nehigroskopan, fleksibilan i čvrst te kemijski inertan prema aktivnom sastojku. Najviše se koristi želatina, guma arabika, škrob, metilceluloza, hidrosimetilceluloza, karboksimetilceluloza, polietilen, poliamid, parafin, stearinska kiselina i gliceril stearat (Bansode i sur., 2010). Osim navedenih materijala, primjenu u mikroinkapsulaciji je našao i alginat, primarno zbog svoje razgradivosti, netoksičnosti i povoljne cijene. Alginat je negativno nabijen biopolimer prirodno prisutan u algama i bakterijama. Sastoji se od  $\alpha$ -L-glukuronske i  $\beta$ -D-manuronske kiseline međusobno povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama (Thach i Thuy, 2019). U prisustvu dvovalentnih kationa, poput  $\text{Ca}^{2+}$ , alginat iskazuje svoju sposobnost geliranja pa se, zajedno s kalcijem, često koristi u mikroinkapsuliranju različitih vrsta ekstrakata (slika 1).



**Slika 1.** Prikaz geliranja alginata u prisustvu kalcijevih iona (Miere i sur., 2019).

Aktivni sastojak može biti kruta tvar, tekućina ili plin. Često su to esencijalna ulja, polifenoli (slika 2) ili drugi biljni spojevi, enzimi i bakterije mliječne kiseline (probiotici i starter kulture). Odvajanje mikroorganizama zaštitnim slojem kapsule eliminira problem niske stope preživljavanja bakterijskih kultura i tako poboljšava zdravlje crijevne mikroflore. Provođenje daljnjih znanstvenih istraživanja na ovom području trebalo bi omogućiti razvoj nove funkcionalne hrane (Nazzaro i sur., 2012). Posljednjih su se godina u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji počele inkapsulirati i nanočestice. Posebno su zanimljive zbog mogućnosti apsorpcije iz tankog crijeva u krv bez prodiranja u enterocite, prolaskom između njih. Ipak, njihovu stabilnost narušavaju niski pH želuca i probavni enzimi pa ih je, za optimiziranje djelovanja, potrebno detaljnije ispitati (Chang, 2019).



**Slika 2.** Prikaz mikrokapsule u kojoj su aktivne tvari polifenoli (Nazzaro i sur., 2011).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

U ovom su radu tekući biljni ekstrakti pripremljeni korištenjem pet različitih vrsta osušenih biljaka: matičnjaka (*Melissa officinalis*), mente (*Mentha x piperita*), majčine dušice (*Thymus serpyllum*), kadulje (*Salvia officinalis*) i lavande (*Lavandula angustifolia*) dobavljača Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska), berba 2018. godine.

#### 3.1.1 Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka)
- Uljna kupelj (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- Magnetna miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija)
- Eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- Centrifuga (Hettich, Kirchlengern, Njemačka)
- Konduktometar (Seven Compact, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik (Inkolab ST605, Zagreb, Hrvatska)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)
- Vorteks (Biosan V-1 plus, Riga, Latvija)
- pH-metar (Seven Compact, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Mikroskop i kamera (Motic B series, Motic Europe, Barcelona, Španjolska)

Pribor:

- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete volumena 5 i 10 mL
- Mikropipete volumena 100  $\mu$ L, 500  $\mu$ L i 1 mL
- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Falcon kivete
- Odmjerne tikvice volumena 250 mL
- Čaše

- Menzure
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić
- Filter papir
- Mikrofilteri promjera pora 20  $\mu\text{m}$  (LLG Labware, Meckheim, Njemačka)
- Tarionik s tučkom
- Aluminijske posudice za sušenje
- Kaliper
- Šprice s iglom
- Cjedilo
- Špatule
- Štoperica

### 3.1.2. Reagensi

- Destilirana voda
- Natrijev alginat ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$ ) (Fisherscientific, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Kalcijev klorid bezvodni ( $\text{CaCl}_2$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (J.T. Naker, Hampton, New Hampshire, Sjedinjene Američke Države)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Klorovodična kiselina 37 % ( $\text{HCl}$ ) (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Octena kiselina 99,5 % ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja)
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Željezo(III)-klorid-heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Željezo(II)-sulfat-heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Fosfatni pufer, 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$
- Natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)

- $\alpha$ -amilaza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Pepsin (Fisher Scientific UK, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )
- Pankreatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Žučne soli (Sigma-Aldrich, Auckland, Novi Zeland)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox ili TE,  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Galna kiselina 98 % ( $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$ ) (Across Organics, Geel, Belgija)

## 3.2. METODE

Postupak opisan u ovome poglavlju primijenjen je na isti način na svim korištenim biljnim uzorcima.

### 3.2.1. Proizvodnja tekućih biljnih ekstrakta

U staklenu čašu volumena 2 litre odvaže se 12 g uzorka usitnjenog osušenog bilja te se prelije sa 600 mL destilirane vode zagrijane na temperaturu od 80 °C. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na istoj temperaturi u uljnoj kupelji (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka) pri 250 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) tijekom pola sata. Nakon isteka zadanog vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze. Odvoji se 150 mL pripremljenog vodenog ekstrakta za određivanje pH vrijednosti, vodljivosti, ukupnih otopljenih tvari, suhe tvari, koncentracije ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta DPPH i FRAP metodom (detaljnije pojašnjene u nastavku). Ostatak tekućeg ekstrakta (450 mL) koristi se za mikroinkapsulaciju.

### 3.2.2. Postupak pripreme mikrokapsula

Pripremi se 3 % (w/w) otopina natrijeva alginata u destiliranoj vodi te se dobro homogenizira na magnetnoj miješalici (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija) pri 300 rpm. Pripremi se i 2 % (w/w) otopina kalcijeva klorida koja služi za prihvat mikrokapsula. Otopina alginata stavlja se u špricu s iglom. Pažljivim i ujednačenim stiskanjem šprice, otopina alginata se prenosi u otopinu kalcijeva klorida. Nakon što je sav alginat istisnut iz šprice u otopinu, mikrokapsule se ostave da se stabiliziraju u kalcijevom kloridu 30 minuta. Zatim se profiltriraju, osuše na zraku pa spremne u eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal).

### 3.2.3. Adsorpcija ekstrakata na mikrokapsule

Nakon što su se kuglice dobro posušile, izdvoji se 30 g kuglica, doda u 450 mL ekstrakta te se ostavi da odstoji preko noći na magnetnoj miješalici (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija) pri 250 rpm. Nakon toga, kuglice se profiltriraju, dobro obrišu papirnatim ubrusom i stave u eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal). Slijede analize fizikalnih i kemijskih svojstava te *in vitro* probavljivosti.



### 3.2.4. Analiza fizikalnih svojstava ekstrakata i mikrokapsula

#### 3.2.4.1. Vodljivost i TDS

Vodljivost i ukupna količina otopljenih tvari (engl. *Total Dissolved Solids*, TDS) određuju se pomoću konduktometra (Seven Compact, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) uranjanjem sonde u tekući ekstrakt. Mjerenja se provode za tekuće i inkapsulirane ekstrakte.

#### 3.2.4.2. Suha tvar

U suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem odvaži se po 3 grama uzorka. Posudice s uzorkom se prenesu u sušionik s automatskom regulacijom temperature (Inkolab ST605, Zagreb, Hrvatska) gdje se drže otvorene 3 sata pri 105 °C. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku, prenesu u eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal) te hlade na sobnoj temperaturi. Vaganjem na analitičkoj vagi (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka) zabilježi se konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

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

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

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

gdje je:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

#### 3.2.4.3. Analiza veličine i izgleda mikrokapsula

Pomoću kalipera se mjeri promjer proizvedenih kuglica, prije i nakon adsorpcije tekućeg ekstrakta. Određuje se i njihova masa na analitičkoj vagi (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka). Korištenjem mikroskopa i kamere (Motic B series, Motic Europe, Barcelona, Španjolska) dobiven je uvid u izgled površine i presjeka mikrokapsula.

### 3.2.5. Kemijske analize

#### 3.2.5.1. Priprema mikrokapsula za kemijske analize

Mikrokapsule (1 g) se mehanički gnječe pomoću tarionika i tučka. Materijalu se doda 2 mL destilirane vode i dobro homogenizira. Smjesa se prebaci u Falcon kivetu, centrifugira (Hettich, Kirchlengern, Njemačka) pri 6000 rpm te se supernatant koristi za daljnje analize.

#### 3.2.5.2. Određivanje ukupnih polifenola (TPC)

Ukupan sadržaj polifenola (engl. *Total Phenolic Content*, TPC) u određenom uzorku utvrđuje se na temelju reakcije prisutnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Ovaj je reagens smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koje se, u interakciji s polifenolima iz uzorka, reduciraju u istoimene okside. Redukciju prati nastanak plavog obojenja čiji je intezitet proporcionalan broju oksidirajućih skupina u fenolnim spojevima (Marić, 2017).

U epruvetu se otpipetira uzorak (100  $\mu\text{L}$  tekućeg ekstrakta ili supernatanta mikrokapsula), destilirana voda (7,9 mL), Folin-Ciocalteu reagens (500  $\mu\text{L}$ ) i 20 %-tna otopina natrijeva karbonata (1,5 mL). Dodatkom otopine karbonata pokreće se reakcija. Nakon što su uzorci odstajali 2 sata na sobnoj temperaturi, pomoću spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska) se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm. Osim uzoraka, priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke (umjesto uzorka sadrži 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (slika 3), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)  $\text{L}^{-1}$  ili  $\text{g}^{-1}$  uzorka.

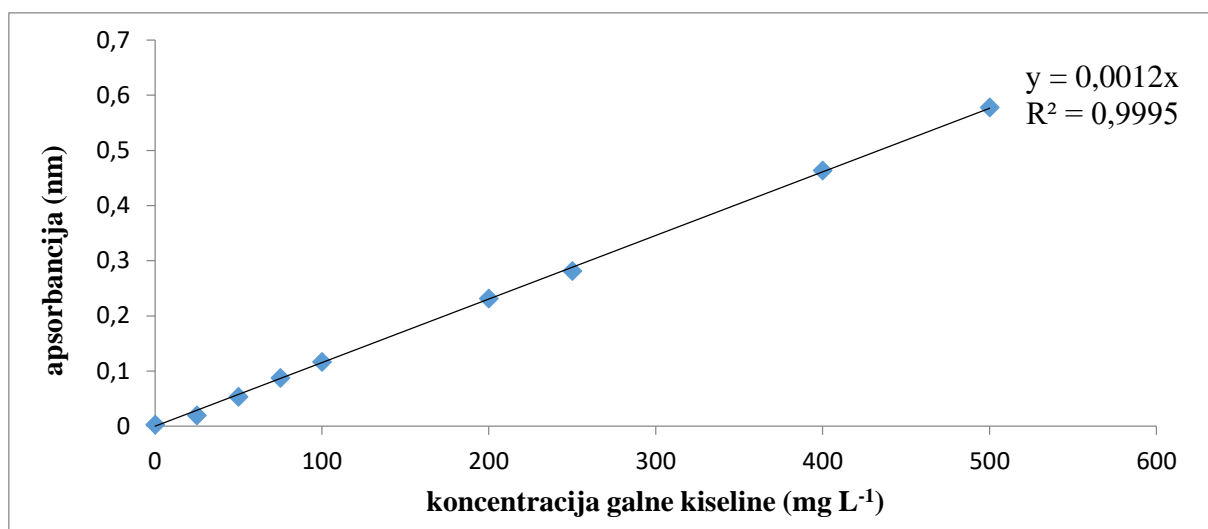
Jednadžba pravca glasi:

$$y=0,0012x \quad [3]$$

gdje je:

x-koncentracija otopine galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

y-izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm



**Slika 3.** Baždarni pravac galne kiseline.

### 3.2.5.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Metoda se temelji na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH $\cdot$ ) izlaganjem uzorku koji sadrži antioksidanse. Otopina DPPH $\cdot$  u metanolu je intenzivne ljubičaste boje koja prelazi u žutu stvaranjem kovalentne veze između radikala i doniranog vodikova atoma (Koksal i sur., 2011). Stupanj promjene boje odgovara antioksidativnoj moći komponenata u uzorku. Kao standard za preračunavanje dobivenih rezultata, ova metoda koristi Trolox, analog vitamina E topljiv u vodi (Benzie i Strain, 1996).

Pripremi se 0,094 mmol L<sup>-1</sup> otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH $\cdot$ ) u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetira se 100  $\mu$ L ispitivanog uzorka (tekućeg ekstrakta ili supernatanta mikrokapsula) i doda 3,9 mL 0,094 mmol L<sup>-1</sup> otopine DPPH $\cdot$  te dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 minuta u mraku nakon čega se, pomoću spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska), mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Troloxa kao standarda, konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji (slika 4). Promjena apsorbancije ( $\Delta A$ ) DPPH radikala nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe. Rezultati  $\Delta A$  preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol L<sup>-1</sup> Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni (mmol g<sup>-1</sup>) ili maseni udio (mg g<sup>-1</sup> uzorka) ekvivalenta Troloxa.

Jednadžba baždarnog pravca glasi:

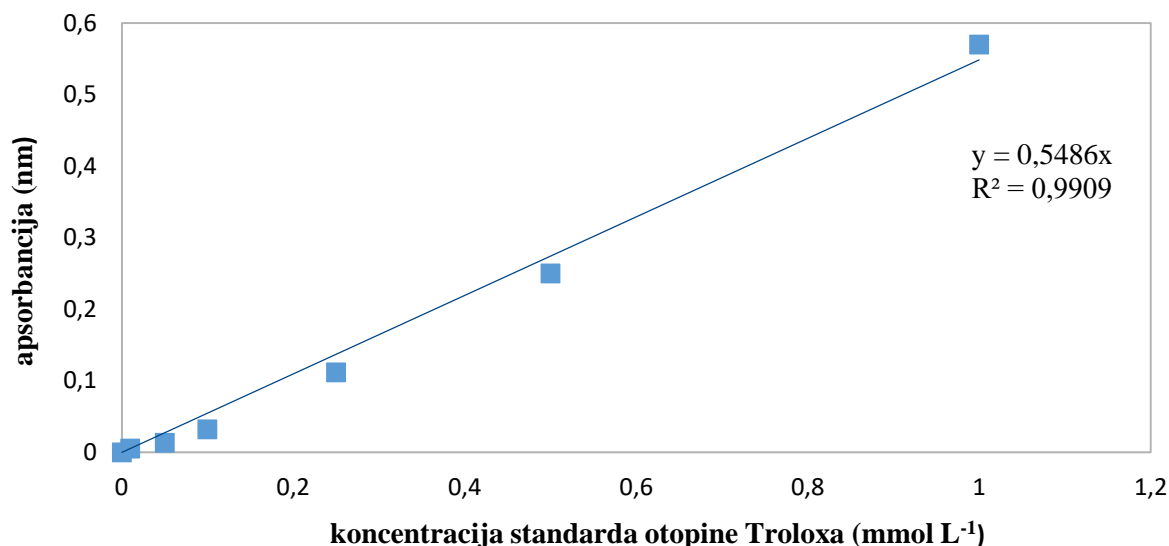
$$y=0,5486x$$

[4]

gdje je:

x-koncentracija standarda otopine Troloxa ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

y-izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm



**Slika 4.** Baždarni pravac Troloxa.

#### 3.2.5.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda se temelji na redukciji željeza (iz  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ ) unutar kompleksa s 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazinom. Pri niskom pH i apsorbanciji od 593 nm, ova se redukcija očituje promjenom boje iz žute u intenzivnu plavu (Benzie i Strain, 1996). Što je veća redukcijska sposobnost antioksidansa prisutnih u uzorku, intenzitet plavog obojenja će biti izraženiji (Stažić, 2019).

Potrebno je pripremiti acetatni pufer ( $300 \text{ mmol L}^{-1}$ ), otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) te vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ). FRAP reagens priprema se miješanjem 25 mL acetatnog pufera s 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  tako da omjer dodanih otopina bude 10 : 1 : 1. Za postupak mjerenja, u kivetu se pomiješa 50  $\mu\text{L}$  uzorka (tekućeg ili inkapsuliranog) i 950  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija na  $\lambda = 593 \text{ nm}$  (UV-VIS spektrofotometar - Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska). Slijepa proba se priprema tako da se, umjesto uzorka, 50  $\mu\text{L}$  vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa. Pomoću izmjerenih

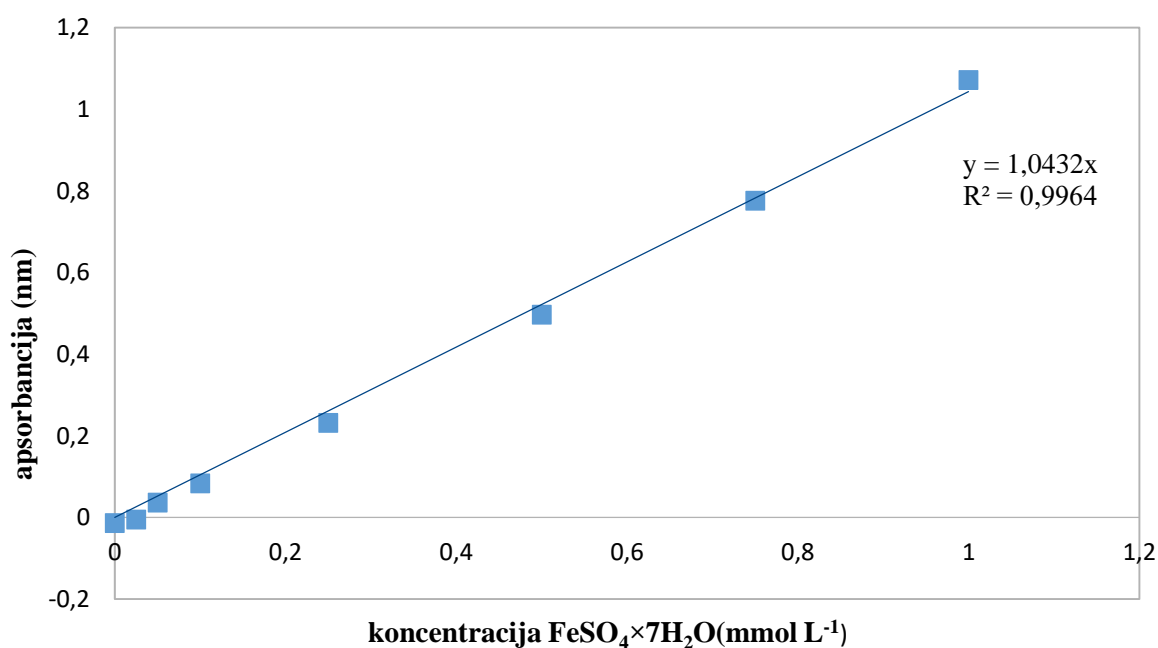
vrijednosti apsorbancije, na baždarnom se pravcu (slika 5) očitavaju ekvivalentne koncentracije  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , a u masene udjele ( $\text{mg g}^{-1}$ ) preračunavaju se prema jednadžbi pravca:

$$y = 1,0432x \quad [5]$$

gdje je:

x-koncentracija  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

y-izmjerene vrijednosti apsorbancije (nm)



**Slika 5.** Baždarni pravac  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.2.6. Kinetika otpuštanja aktivnih tvari iz mikrokapsula

Kinetički pokusi otpuštanja aktivne tvari iz mikrokapsula provode se otapanjem 18 g kuglica u 105 mL vode pri sobnoj temperaturi na magnetnoj miješalici (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija) namještenoj na 100 rpm. Izuzima se po 700  $\mu\text{L}$  uzorka u određenim vremenskim intervalima (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70, 80 i 90 minuta). Uzorci se odmah nakon izuzimanja ohlade u smjesi leda i vode te im se kasnije određuje TDS, vodljivost, DPPH i ukupan sadržaj polifenola.

### 3.2.7. *In vitro* simulacija probavnog sustava

*In vitro* simulacija probavnog procesa započinje korakom koji simulira uvjete u ustima. Odvaže se 40 mg  $\alpha$ -amilaze i otopi u 40 mL fosfatnog pufera zajedno s 0,04 % natrijevim kloridom i 0,004 % kalcijevim kloridom. Dodani kloridi su potrebni za aktivaciju enzima. Tako pripremljena otopina stavi se u uljnu kupelj (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka) i zagrije na temperaturu od 37 °C. Kada se dostigne potrebna temperatura, doda se uzorak (4 mL tekućeg ekstrakta odnosno 4 g mikrokapsula) i pokrene štoperica. Inkubacija traje 5 minuta.

Za nastavak procesa probave, potrebno je pH reakcijske mješavine, pomoću koncentrirane klorovodične kiseline (HCl), namjestiti na 2, čime se simuliraju uvjeti probave u želucu. Potom se dodaje suspenzija pepsina (60 mg pepsina otopljenog u 4 ml 0,01 mol L<sup>-1</sup> HCl-a) te se reakcijska mješavina inkubira na 2 sata pri 37 °C. Nakon završetka inkubacije, dodaje se natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) te tako pH vrijednost raste do 6,5. Uvjeti u tankom crijevu simuliraju se dodatkom suspenzije pankreatina i žučnih soli (0,08 g pankreatina i 0,5 g žučnih soli otapaju se u 10 mL fosfatnog pufera). Mješavina se inkubira na 2 sata pri 37 °C. Mikropipetom se izuzme 1 mL uzorka i stavlja u smjesu vode i leda. Uzorak se mora odmah ohladiti kako bi se inaktivirali probavni enzimi te profiltrirati kroz mikrofilter radi uklanjanja ostatka proteina koji bi mogli smetati u određivanju koncentracije polifenola i antioksidacijskog kapaciteta. Reakcijska mješavina se uklanja s uljne kupelji (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka).

Uzorcima dobivenim nakon inkubacije određuje se sadržaj ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet.

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Eksperimentalno dobiveni podaci statistički su obrađeni primjenom probne verzije softvera Statistica 13.3 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD). Prije obrade podaci su testirani na normalnost razdiobe primjenom Kolmogorov-Smirnov testa, a nakon što je utvrđena normalna razdioba proveden je t-test za nezavisne uzorke sa razinom značajnosti od  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu analizirana *in vitro* stabilnost pet vrsta biljnih ekstrakata u tekućem i mikroinkapsuliranom obliku: matičnjaka (*Melissa officinalis*), mente (*Mentha x piperita*), majčine dušice (*Thymus serpyllum*), kadulje (*Salvia officinalis*) i lavande (*Lavandula angustifolia*). Dobiveni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Fizikalna i kemijska svojstva tekućih ekstrakata prije adsorpcije prikazana su u Tablicama 1 i 2, a nakon adsorpcije u Tablicama 3 i 4. Tablica 5 daje uvid u fizikalna svojstva proizvedenih praznih i mikrokapsula s adsorbiranim ekstraktom, a izgled njihova presjeka i površine vidljiv je na slici 6. Rezultati kemijskih analiza provedenih na supernatantima mikrokapsula zabilježeni su u Tablici 6. Iste su fizikalne i kemijske metode korištene za ispitivanje otpuštanja aktivnih tvari iz mikrokapsula u vodenome mediju. Ovisnost promjena izmjenjenih vrijednosti o vremenu izlaganja kapsula vodi prikazana je grafički na slikama 7-11. Nadalje, preostali je dio tekućih i inkapsuliranih ekstrakata propušten kroz simulirani probavni sustav te potom ponovno analiziran. Usporedba kemijskih svojstava početnih i probavljenih uzoraka prikazana je u Tablicama 7 (tekući ekstrakti) i 8 (mikroinkapsulirani ekstrakti). Na temelju podataka iz ovih tablica, izračunat je postotak preživljavanja za svaku vrstu biljnog uzorka te je uvršten u Tablicu 9.



#### 4.1. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA

Tekući uzorci dobiveni su ekstrakcijom osušenog biljnog materijala. Nakon hlađenja, ekstrakti su podvrgnuti ispitivanjima u svrhu određivanja njihovih početnih svojstava. Od fizikalnih svojstava ispitivana je pH vrijednost, ukupan sadržaj otopljenih tvari (TDS), vodljivost i udio suhe tvari.

##### 4.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata prije adsorpcije

Fizikalna svojstva tekućih ekstrakata prije adsorpcije prikazana su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Fizikalna svojstva ekstrakata prije adsorpcije. Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ .

TEKUĆI EKSTRAKT	pH	TDS (mg L <sup>-1</sup> )	VODLJIVOST (μS cm <sup>-1</sup> )	SUHA TVAR (%)
matičnjak	5,86 <sup>a</sup>	832 <sup>a</sup>	1642 <sup>a</sup>	0,693±0,0107 <sup>a</sup>
menta	6,18 <sup>b</sup>	633 <sup>b</sup>	1296 <sup>b</sup>	0,657±0,016 <sup>b</sup>
majčina dušica	6,05 <sup>c</sup>	540 <sup>c</sup>	1067 <sup>c</sup>	0,694±0,010 <sup>a</sup>
kadulja	5,78 <sup>d</sup>	489 <sup>d</sup>	986 <sup>d</sup>	0,543±0,049 <sup>c</sup>
lavanda	4,96 <sup>e</sup>	585 <sup>e</sup>	1150 <sup>e</sup>	0,525±0,009 <sup>c</sup>

pH vrijednost je varirala od 4,96 za lavandu do 6,18 za mentu (Tablica 1). Najviše otopljenih tvari (832 mg L<sup>-1</sup>) sadržavao je ekstrakt matičnjaka, a najmanje ekstrakt kadulje (489 mg L<sup>-1</sup>). Izmjerena vodljivost je, sukladno očekivanjima, u korelaciji s vrijednošću za ukupne otopljene tvari (Cvetković i sur., 2018; Siosemarde i sur., 2010). Tako se vodljivost kretala od 986 do 1642 μS cm<sup>-1</sup>. Analizirani ekstrakti i ranije su bili predmet ispitivanja gdje su im određivana ista svojstva. Prema Marić (2017), trend kretanja vrijednosti za ukupne otopljene tvari i vodljivost prati kretanje pH. Rezultati prikazani u Tablicama 1 i 3 pokazuju da, u ovom istraživanju, navedena korelacija nije uočena. Ipak, raspon pH vrijednosti izmjeren u tekućim ekstraktima ne odstupa znatno od onog kojeg je Marić prikazala (od 4,56 do 6,82). U usporedbi s njezinim rezultatima, vrijednosti dobivene za TDS i vodljivost su nešto niže.

U istraživanju koje je Marić provela, kadulja se pokazala ekstraktom s najviše otopljenih tvari (1019 mg L<sup>-1</sup>). Suprotno tome, iz Tablice 1 je vidljivo da je TDS vrijednost izmjerena za kadulju bila najniža (489 mg L<sup>-1</sup>). Nešto viša koncentracija otopljenih tvari izmjerena je u ekstraktu majčine dušice (540 mg L<sup>-1</sup>), zatim lavande (589 mg L<sup>-1</sup>) i mente (633 mg L<sup>-1</sup>). Udio suhe tvari kretao se u rasponu od 0,525 % (lavanda) do 0,694 % (majčina dušica). Izračunate su vrijednosti unutar raspona udjela suhe tvari izmjerenih u radu Marić (od 0,31 % za majčinu dušicu do 0,75 % za mentu).

Nakon fizikalnih, uzorcima su ispitivana i kemijska svojstva. Ukupan sadržaj polifenola (TPC) i antioksidacijska aktivnost (DPPH i FRAP metoda) određeni su spektrofotometrijski. Dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 2.

**Tablica 2.** Kemijska svojstva ekstrakata prije adsorpcije. Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ .

TEKUĆI EKSTRAKT	TPC (mg GAE g <sup>-1</sup> ekstrakta)	DPPH (mmol TE g <sup>-1</sup> ekstrakta)	FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> ekstrakta)
matičnjak	73,75±1,77 <sup>a</sup>	0,576±0,021 <sup>a</sup>	0,806±0,005 <sup>a</sup>
menta	45,42±1,77 <sup>b</sup>	0,471±0,042 <sup>b</sup>	0,533±0,024 <sup>b</sup>
majčina dušica	38,75±0,59 <sup>c</sup>	0,359±0,002 <sup>c</sup>	0,501±0,032 <sup>c</sup>
kadulja	51,25±2,95 <sup>d</sup>	0,416±0,009 <sup>d</sup>	0,633±0,023 <sup>d</sup>
lavanda	22,50±7,07 <sup>e</sup>	0,237±0,018 <sup>e</sup>	0,440±0,002 <sup>c</sup>

Najveća koncentracija ukupnih polifenola izmjerena je za ekstrakt matičnjaka (73,75 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta), zatim kadulje, mente i majčine dušice, a najmanja za ekstrakt lavande (22,50 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta; Tablica 2). Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti korištene su dvije metode: DPPH i FRAP. Najuspješniji u uklanjanju DPPH radikala bio je uzorak matičnjaka, što znači da je pokazao najveću antioksidativnu aktivnost (0,576 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Nasuprot tome, lavanda se, primjenom DPPH metode, pokazala kao uzorak s najmanjim antioksidativnim potencijalom (0,237 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Isto je potvrđeno FRAP metodom (0,806 za matičnjak i 0,440 mmol FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> ekstrakta za lavandu), a odgovara i ukupnom udjelu polifenola. Ostala su tri ekstrakta, kod mjerenja antioksidacijske

aktivnosti FRAP metodom, također pokazala podudarnost s udjelom polifenola (kadulja > menta > majčina dušica). Pozitivnu korelaciju između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidacijskog potencijala izmjerenog FRAP metodom potvrdilo je istraživanje Marić (2017), ali i drugi radovi (Dudonné i sur., 2009; Katalinić i sur., 2006; Wong i sur., 2006). Kod mjerenja DPPH metodom (Tablica 2), ovdje je, pak, došlo do manjeg odstupanja (menta > kadulja > majčina dušica). Razlike u afinitetima DPPH i FRAP metode prema spojevima nastaju zbog utjecaja pH vrijednosti na redukcijski kapacitet antioksidansa. Naime, pri visokom pH proton disocira s antioksidativne tvari i tako povećava reduktivnu snagu uzorka. Nasuprot tome, pri niskome pH dolazi do protoniranja antioksidansa i posljedično, smanjenja reduktivne snage uzorka (Huang i sur., 2005). Gotovo isti trend kretanja vrijednosti kao kod DPPH metode zabilježen je u rezultatima izmjerenim za TDS. Navedena je povezanost u skladu s teorijom prema kojoj je ukupna količina otopljenih tvari dobar pokazatelj antioksidacijske aktivnosti uzorka (Saad i sur., 2015).

Prema Marić (2017), od ispitivanih biljnih vrsta najmanji udio polifenola imala je kadulja, što je u suprotnosti s rezultatima koje su prikazali Generalić Mekinić i sur. (2014). U njihovom se istraživanju kadulja pokazala kao vrsta s najvećom koncentracijom polifenola, a slijedili su je matičnjak, majčina dušica i menta. Lavanda nije bila analizirana. DPPH i FRAP metoda pokazale su podudarne rezultate za antioksidacijsku aktivnost uzoraka (matičnjak > majčina dušica > menta > kadulja). U ovom su eksperimentu najviše vrijednosti za antioksidacijsku aktivnost također izmjerene za ekstrakt matičnjaka. Razlika je u tome što su, u radu Generalić Mekinić i suradnika, uzorci ekstrahirani pomoću otopine etanola (etanol:voda=80:20), a ne vodom. Osim upotrebi različitih otapala za ekstrakciju, razlike u rezultatima mogu se pripisati i različitim godinama berbe.

Sve biljne vrste analizirane u ovom radu pripadaju potporodici *Nepetoideae*. *Dracocephalum moldavica*, *Ocimum americanum* i *Satureja hortensis* također su dio ove potporodice pa su im svojstva vrlo slična ovdje ispitivanim biljkama. Godine 2018. bile su predmet istraživanja gdje im se, između ostalog, određivao i ukupan sadržaj polifenola. Vodeni ekstrakti pripremljeni su na isti način, a izmjereni TPC je iznosio od 147 do 327 mg GAE 200 mL<sup>-1</sup> ekstrakta (Shanaida i sur., 2018). Preračunavanjem rezultata dobivenih u ovom eksperimentu, došlo se do raspona vrijednosti od 90 do 295 mg GAE 200 mL<sup>-1</sup> ekstrakta. Budući da im je raspon izmjerenih vrijednosti blizak, usporedba ovih dvaju istraživanja potvrđuje da biljne vrste unutar iste potporodice imaju i sličan kemijski sastav.

#### 4.1.2. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata nakon adsorpcije

U početni su ekstrakt dodane kuglice s namjerom da adsorbiraju sadržaj uzorka. Kako bi se utvrdio utjecaj adsorpcije na ekstrakte, ponovno su im određivana ista svojstva (Tablica 3 i 4).

**Tablica 3.** Fizikalna svojstva ekstrakata nakon adsorpcije. Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ .

TEKUĆI EKSTRAKT	pH	TDS (mg L <sup>-1</sup> )	VODLJIVOST (μS cm <sup>-1</sup> )	SUHA TVAR (%)
matičnjak	6,01 <sup>a</sup>	1163 <sup>a</sup>	2330 <sup>a</sup>	0,658±0,013 <sup>a</sup>
menta	6,05 <sup>b</sup>	933 <sup>b</sup>	1845 <sup>b</sup>	0,652±0,035 <sup>a</sup>
majčina dušica	6,20 <sup>c</sup>	803 <sup>c</sup>	1611 <sup>c</sup>	0,350±0,034 <sup>b</sup>
kadulja	5,84 <sup>d</sup>	959 <sup>a</sup>	1901 <sup>a</sup>	0,529±0,009 <sup>c</sup>
lavanda	5,02 <sup>e</sup>	983 <sup>a</sup>	1971 <sup>a</sup>	0,428±0,026 <sup>d</sup>

Kod svih je uzoraka pH vrijednost nakon adsorpcije bila nešto viša, izuzev mente, gdje je došlo do smanjenja iste (sa 6,18 na 6,05; Tablice 1 i 3). Porast pH vrijednosti posljedica je prijenosa kiselih aktivnih tvari iz ekstrakata u mikrokapsule. Suprotno očekivanom, vrijednosti za ukupni udio otopljenih tvari, pa tako i za vodljivost, bile su više nakon adsorpcije ekstrakata u kuglice. Tako je vodljivost u ekstraktima prije adsorpcije iznosila od 986 do 1642 μS cm<sup>-1</sup>, dok su nakon adsorpcije izmjerene vrijednosti od 1845 do 2330 μS cm<sup>-1</sup> (Tablica 3). Pretpostavka je da je dio kalcijeva klorida, korištenog za prihvatanje mikrokapsula, zaostao u ekstraktima prilikom adsorpcije i tako doprinio povećanju ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti. Udio suhe tvari (od 0,428% do 0,658 %) bio je nešto niži nego u početnom ekstraktu (od 0,525 % do 0,694 %), što ukazuje na to da su mikrokapsule uspješno adsorbirale dio ne hlapljivih tvari iz tekućih ekstrakata. Kako bi se utvrdilo koliko je adsorpcija kiselih i ne hlapljivih tvari utjecala na antioksidacijski potencijal ekstrakata, na istima su provedene i kemijske analize. Iako brojna istraživanja u literaturi uspoređuju fizikalna svojstva tekućih i inkapsuliranih ekstrakata, ne postoje podaci o svojstvima tekućih ekstrakata nakon adsorpcije na alginat.

**Tablica 4.** Kemijska svojstva ekstrakata nakon adsorpcije. Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ .

TEKUĆI EKSTRAKT	TPC (mg GAE g <sup>-1</sup> ekstrakta)	DPPH (mmol TE g <sup>-1</sup> ekstrakta)	FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> ekstrakta)
<b>matičnjak</b>	60,42±1,77 <sup>a</sup>	0,561±0,006 <sup>a</sup>	0,692±0,039 <sup>a</sup>
<b>menta</b>	51,67±1,18 <sup>b</sup>	0,270±0,014 <sup>b</sup>	0,520±0,016 <sup>b</sup>
<b>majčina dušica</b>	27,08±2,95 <sup>c</sup>	0,239±0,013 <sup>c</sup>	0,305±0,006 <sup>b</sup>
<b>kadulja</b>	47,08±7,66 <sup>b</sup>	0,365±0,004 <sup>d</sup>	0,584±0,011 <sup>c</sup>
<b>lavanda</b>	20,00±2,36 <sup>d</sup>	0,180±0,003 <sup>e</sup>	0,311±0,013 <sup>d</sup>

Parametri koji ukazuju na antioksidacijsku aktivnost uzoraka, DPPH i FRAP, bili su niži (Tablica 4) u odnosu na iste izmjerene u početnim uzorcima (Tablica 2). Tako se raspon vrijednosti izmjeren DPPH metodom snizio sa 0,237-0,576 na 0,180-0,561 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta, dok je kod FRAP metode zabilježena promjena s 0,440-0,806 na 0,311-0,692 mmol FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> ekstrakta (Tablica 4). Uzevši u obzir istaknute promjene u vrijednostima, može se zaključiti da su kuglice adsorbirale dio spojeva s antioksidacijskom aktivnošću. Ovo potvrđuju i izračunate koncentracije polifenola u ekstraktima prije i nakon dodatka mikrokapsula. Raspon koncentracija polifenola u ekstraktima nakon adsorpcije iznosio je od 20,00 do 60,42 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta, što je niže u odnosu na početne izmjerene vrijednosti (od 22,50 do 73,75 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta; Tablica 2). Iznimka je jedino menta kojoj je, zbog eksperimentalne greške, izmjeren nešto viši udio polifenola nego u početnom uzorku.

Najviše brojčane vrijednosti kod sve tri kemijske analize imao je ekstrakt matičnjaka, dok su najmanje vrijednosti pokazali ekstrakti majčine dušice i lavande. Lavanda ima visoki udio esencijalnih ulja koja, zbog odabrane metode ekstrakcije, nisu mogla prijeći u tekući ekstrakt pa je moguće da je zbog toga u lavandi izmjerena niža koncentracija ukupnih otopljenih tvari, kao i slabija antioksidacijska aktivnost (Jurinjak Tušek i sur., 2020). Poredak vrijednosti u ekstraktima nakon, odgovora i onome uočenom u ekstraktima prije adsorpcije, pa je za očekivati da će vrlo sličan odnos vrijednosti biti zabilježen u i mikroinkapsuliranim ekstraktima.

Godine 2013. objavljeni su rezultati istraživanja u kojemu se na sličan način ispitivalo djelovanje antioksidansa iz biljnih ekstrakata (Aprotosoie i sur., 2013). Kao uzorak se koristilo šest vrsta ljekovitog bilja: *Melissa officinalis* (matičnjak), *Lavandula officinalis* (lavanda), *Rosmarinus officinalis* (ružmarin), *Mentha piperita* (paprena metvica), *Thymus vulgaris* (vrtni timijan) i *Salvia pratensis* (livadna kadulja). Sasušeni dijelovi biljaka ekstrahirali su se 50 %-tnim i 70 %-tnim etanolom. Ukupan sadržaj polifenola određivao se uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa, koristeći galnu kiselinu kao standard. 50 %-tni etanol se pokazao boljim ekstrakcijskim sredstvom polifenola u odnosu na 70 %-tni. Najniži udio polifenola imala je lavanda, a najviši matičnjak. Na isti zaključak navode i rezultati ovog rada (Tablice 2 i 4), iako je kao otapalo korištena voda, a ne etanol.

Antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta matičnjaka ranije je određivana usporedno s aktivnošću etanolnog ekstrakta iste biljne vrste (Koksal i sur., 2011). U eksperimentu se koristilo lišće matičnjaka porijeklom iz Turske. Aktivnost ekstrakata ispitivala se dodavanjem različitih koncentracija tekućih uzoraka etanolnoj otopini DPPH radikala. U svrhu dobivanja boljeg uvida u antioksidacijsku moć matičnjaka, na isti su način testirani i standardni antioksidansi: Trolox (TE), butil-hidroksianisol (BHA) i butil-hidroksitoluen (BHT). Prema rezultatima studije, najuspješniji spoj u suzbijanju aktivnosti DPPH radikala je Trolox (94,4 %). Slijede ga BHA (86,7 %), vodeni ekstrakt matičnjaka (47,8 %) i BHT (42,3 %). Najmanje se učinkovitim pokazao etanolni ekstrakt matičnjaka (7,4 %). Za vodeni ekstrakt matičnjaka analiziranog u ovome radu, učinkovitost uklanjanja DPPH radikala iznosila je 73,1%. Usporedbom rezultata može se zaključiti da je ekstrakt matičnjaka korišten u ovom radu uspješniji u uklanjanju DPPH radikala od sintetskog antioksidansa BHT.

Učinkovitost matičnjaka u uklanjanju DPPH· uspoređivana je i s aktivnošću drugih antioksidansa. U radu Katalinić i sur. (2006), vodeni ekstrakt listova matičnjaka (*Melissae folium*) pokazao se boljim inhibitorom DPPH radikala u odnosu na vitamin C i drugih 69 analiziranih biljnih vrsta. Između ostalih, određivala se i antioksidacijska aktivnost lišća mente (*Mentha piperita folium*), kadulje (*Salviae off folium*) i cvijeta lavande (*Lavandulae flos*). Vrijednosti dobivene FRAP metodom iznosile su 25 234 za matičnjak, 8987 za mentu, 7603 za kadulju i 7377  $\mu\text{mol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$  ekstrakta za lavandu. Preračunavajući rezultate za FRAP prikazane u Tablici 2, došlo se do sljedećih vrijednosti: 16 119 (matičnjak), 12 658 (kadulja), 10 655 (menta) i 8795  $\mu\text{mol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$  ekstrakta (lavanda). Iz rezultata je vidljivo da su u ovom radu izmjerene više vrijednosti za antioksidacijsku aktivnost kadulje, mente i lavande, dok su za matičnjak dobivene vrijednosti niže, što se može objasniti razlikama u godinama berbe i geografskom podrijetlu uzorka.

## 4.2. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA MIKROKAPSULA

### 4.2.1. Fizikalna svojstva mikrokapsula

Mikrokapsule na bazi alginata pokazale su se izrazito učinkovitima kod inkapsuliranja različitih komponenti, naročito probiotika (Chang, 2019). Dodavanjem u tekuće biljne ekstrakte, prazne su mikrokapsule adsorbirale dio uzorka. Kako bi se utvrdilo koliko je adsorpcija pojedinog ekstrakta utjecala na njihova fizikalna svojstva, kapsulama je određivan promjer i masa (Tablica 5).

**Tablica 5.** Usporedba izmjerenih promjera i masa mikrokapsula prije i nakon adsorpcije tekućeg biljnog ekstrakta. Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ . \* predstavlja značajnu razliku promjera kapsula prije i nakon adsorpcije.

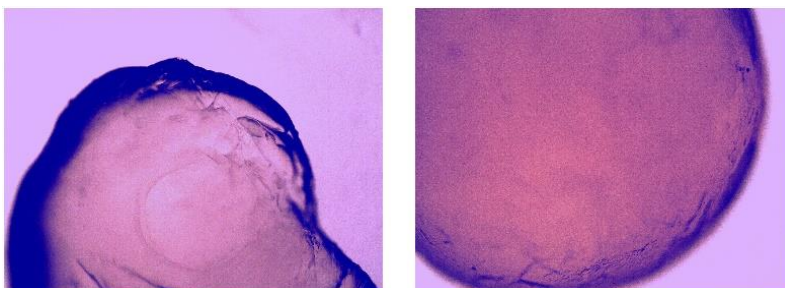
INKAPSULIRANI EKSTRAKT	PROMJER MIKROKAPSULA (mm)		MASA MIKROKAPSULA (g)	
	prije adsorpcije	nakon adsorpcije	prije adsorpcije	nakon adsorpcije
<b>matičnjak</b>	3,22±0,30*	3,29±0,19 <sup>bc</sup>	0,02156±0,00127 <sup>a</sup>	0,02250±0,00196 <sup>a</sup>
<b>menta</b>		3,46±0,24 <sup>b</sup>	0,02176±0,00115 <sup>a</sup>	0,02466±0,00203 <sup>b</sup>
<b>majčina dušica</b>		3,55±0,30 <sup>bc*</sup>	0,02179±0,00135 <sup>a</sup>	0,03224±0,00391 <sup>c</sup>
<b>kadulja</b>		2,67±0,28 <sup>a*</sup>	0,02198±0,00112 <sup>a</sup>	0,01830±0,00444 <sup>d</sup>
<b>lavanda</b>		3,44±0,31 <sup>b</sup>	0,02200±0,00103 <sup>a</sup>	0,02614±0,00381 <sup>b</sup>

Kaliperom određen promjer iznosio je 3,22±0,30 mm za prazne mikrokapsule. Nakon adsorpcije uzoraka, te su vrijednosti iznosile od 2,67±0,28 mm za kadulju do 3,55±0,30 mm za majčinu dušicu. Prema Bušić i sur. (2018), alginatne kapsule dobivene jednostavnom ekstruzijom (kapanjem) imaju promjer od 1 do najviše 6 mm, što je u skladu s ovdje izmjerenim vrijednostima. Proizvedene mikrokapsule podijeljene su u pet grupa, ovisno o tome za adsorpciju kojeg biljnog ekstrakta će se dalje koristiti. Masa praznih mikrokapsula je bila prilično ujednačena (od 0,02156 do 0,02200 mm), dok su mjerenjima mase nakon adsorpcije uočene nešto veće razlike. Tako je najveća pozitivna promjena u masi izmjerena

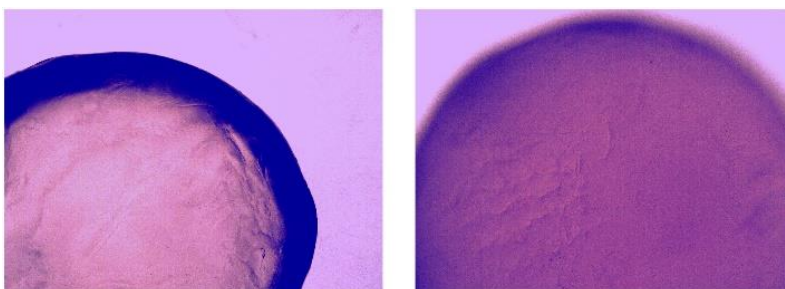
kod kuglica majčine dušice (s 0,02179 na 0,03224 mm), a najmanja kod kuglica matičnjaka (s 0,2156 na 0,2250 mm). Kod kadulje je, pak, došlo do smanjenja mase nakon adsorpcije, što možemo pripisati eventualnim razlikama u uvjetima provođenja postupka (primjerice, pri sušenju mikrokapsula).

Prije same adsorpcije, praznim su mikrokapsulama zabilježena i druga uočena fizikalna svojstva (boja, prozirnost, tekstura). Proizvedene mikrokapsule bile su okruglog oblika, bjelkaste, neprozirne i sjajne. Površina im je bila glatka, bez pora i drugih nepravilnosti vidljivih golim okom. Stoga su prazne mikrokapsule, kao i one s adsorbiranim ekstraktom, promatrane i mikroskopski. U tu je svrhu korišten svjetlosni mikroskop i kamera Motic B series. Izgled površine i presjeka zabilježen je kamerom te prikazan na slici 6.

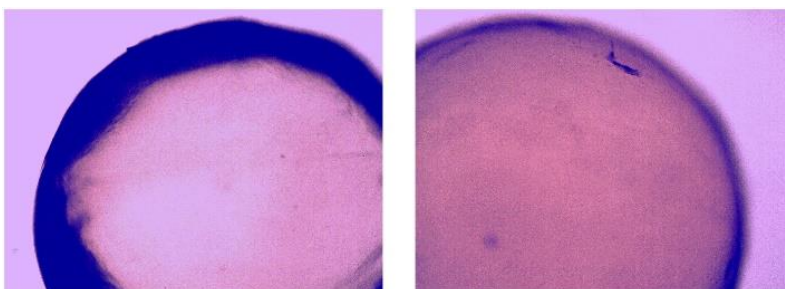
### MATIČNJAK



### MENTA

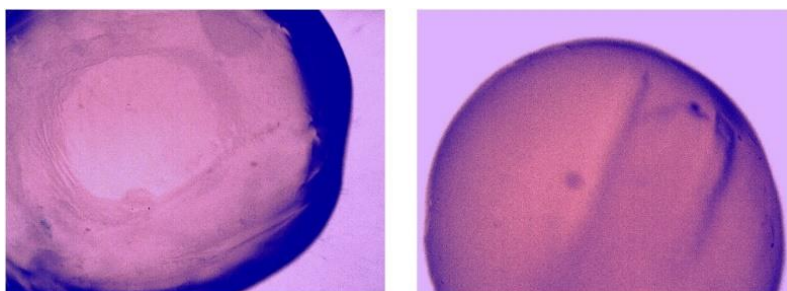


### MAJČINA DUŠICA

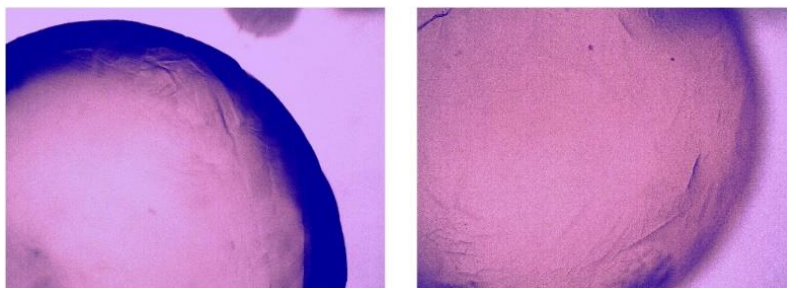




## KADULJA



## LAVANDA



**Slika 6.** Prikaz mikroskopski snimljene površine i presjeka mikro kapsula.

Površina svih vrsta mikro kapsula je glatka, bez vidljivih pora, s pokojim naborom bliže samome omotaču (slika 6). Prema prikazanim presjecima, mikro kapsule lavande i mente imaju najpravilniju građu omotača, dok su kod drugih primjetna mjestimična zadebljanja na istome. Na presjeku mikro kapsule matičnjaka može se uočiti najviše nepravilnosti, kako u omotaču, tako i u samoj šupljini kapsule. Budući da nepravilnosti u šupljini nisu vidljive na ostalim kapsulama, vjerojatno je da je način rezanja površine mikro kapsule matičnjaka utjecao na nastanak ovakve strukture. Promatrajući prikazane presjeke, ne mogu se uočiti značajne razlike u debljini omotača mikro kapsula s različitim inkapsuliranim ekstraktima. Uvid u izgled i strukturu mikro kapsula nužan je za razumijevanje rezultata dobivenih kemijskom analizom istih. Iako nema podataka o tome da bi veličina alginatnih mikro kapsula mogla utjecati na antioksidacijsku aktivnost inkapsuliranog ekstrakta (Stojanović i sur.,2012), postoji mogućnost da utječe na brzinu otpuštanja tvari iz njih (Bušić i sur., 2018). Stoga je ispitivanje fizikalnih svojstva mikro kapsula od posebne važnosti kod inkapsulacije sastojaka čije je produljeno djelovanje u organizmu čovjeka poželjno (primjerice, kofein).

#### 4.2.2. Kemijska svojstva mikro kapsula

Inkapsuliranom ekstraktu određivan je sadržaj ukupnih polifenola (TPC) te antioksidacijski potencijal pomoću DPPH i FRAP metode (Tablica 6).

**Tablica 6.** Kemijska svojstva kuglica nakon adsorpcije. Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ .

<b>INKAPSULIRANI EKSTRAKT</b>	TPC (mg GAE g <sup>-1</sup> kuglica)	DPPH (mmol TE g <sup>-1</sup> kuglica)	FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> ekstrakta)
<b>matičnjak</b>	0,5865±0,0162 <sup>a</sup>	0,0023±0,0000 <sup>a</sup>	0,0062±0,0002 <sup>a</sup>
<b>menta</b>	0,3717±0,0141 <sup>b</sup>	0,0032±0,0000 <sup>b</sup>	0,0041±0,0004 <sup>b</sup>
<b>majčina dušica</b>	0,2542±0,0118 <sup>c</sup>	0,0019±0,0001 <sup>c</sup>	0,0039±0,0003 <sup>c</sup>
<b>kadulja</b>	0,5133±0,0236 <sup>d</sup>	0,0035±0,0000 <sup>d</sup>	0,0057±0,0000 <sup>d</sup>
<b>lavanda</b>	0,1875±0,0412 <sup>e</sup>	0,0008±0,0000 <sup>e</sup>	0,0029±0,0001 <sup>e</sup>

Udio polifenola manji je u kuglicama nego u ekstraktu (Tablica 1, Tablica 6). Za usporedbu, kod tekućeg ekstrakta matičnjaka isti je iznosio 73,75, a kod mikroinkapsuliranog matičnjaka 0,5865 miligrama galne kiseline po gramu uzorka (Tablica 6). Inkapsuliranoj kadulji je izmjerena koncentracija polifenola od 0,5133 mg GAE g<sup>-1</sup> kuglica, dok je u tekućem ekstraktu koncentracija bila deset puta veća (51,25 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Sljedeća najviša koncentracija izračunata je za inkapsuliranu mentu (0,3717 mg GAE g<sup>-1</sup> kuglica u odnosu na početnih 45,42 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta), zatim majčinu dušicu (0,2542 mg GAE g<sup>-1</sup> kuglica u odnosu na 38,75 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta), a najmanja za lavandu (0,1875 mg GAE g<sup>-1</sup> kuglica u odnosu na 22,50 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Ovakav poredak vrijednosti koncentracija polifenola primijećen je i kod tekućih ekstrakata, prije i nakon adsorpcije. Budući da su polifenoli spojevi koji najviše doprinose antioksidacijskom potencijalu testiranih biljnih uzoraka, vrijednosti za DPPH i FRAP također su bile znatno niže kod inkapsuliranih ekstrakata. Tako su u tekućem ekstraktu lavande vrijednosti za ove parametre bile 0,237 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta te 0,440 mmol FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> ekstrakta. Kod mikroinkapsuliranog ekstrakta iste su iznosile tek 0,0008 mmol TE g<sup>-1</sup> kuglica i 0,0029 mmol FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> kuglica.

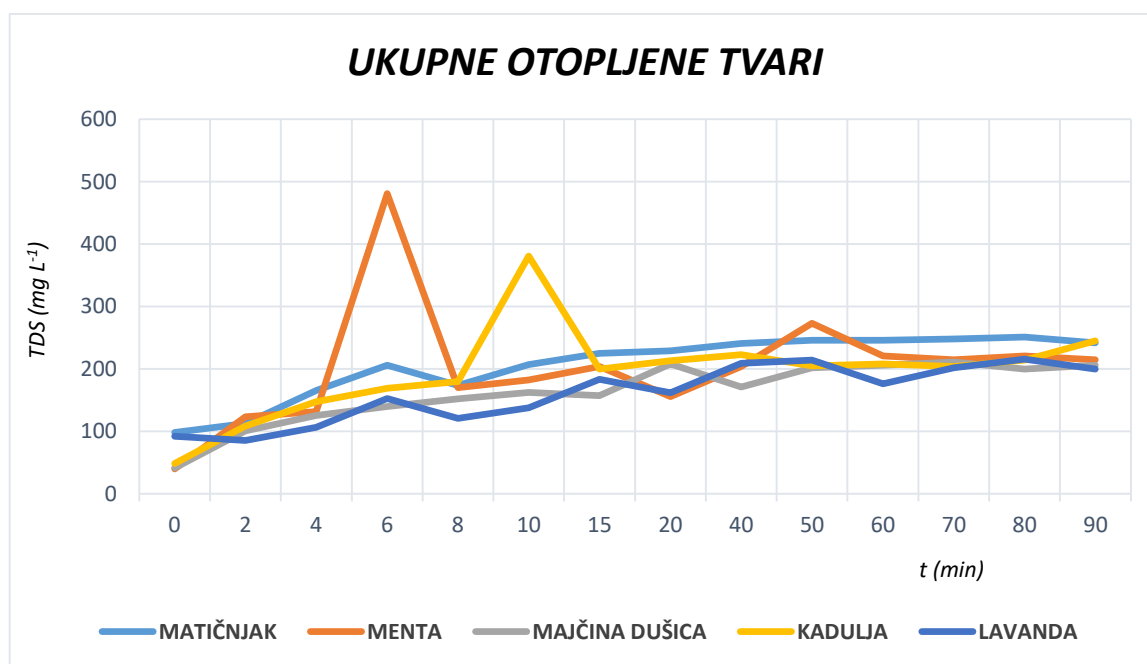
Objekte su vrste ekstrakta lavande (tekući i inkapsulirani) pokazale najmanju antioksidacijsku aktivnost, dok je najveća uočena kod ekstrakata matičnjaka. Ipak, korelacija između vrijednosti dobivenih DPPH i FRAP metodom za ostala tri uzorka nije pronađena. Kao i kod tekućih ekstrakata, odnos između vrijednosti izmjerenih FRAP metodom bio je bliži odnosu izračunatih koncentracija polifenola.

Da antioksidacijski potencijal i koncentracija polifenola u mikroinkapsuliranim ekstraktima prate trend vrijednosti izmjerenih za tekuće ekstrakte, potvrdilo je istraživanje objavljeno prošle godine (Jasso de Rodríguez i sur., 2019). U navedenom su istraživanju analizirana kemijska svojstva tekućih i inkapsuliranih ekstrakata tri vrste roda *Flourensia*. Uzorci su se ekstrahirali pomoću etanola, a za inkapsulaciju je korišten natrijev alginat. U odnosu na tekuće ekstrakte (od 301 do 635 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta), koncentracija polifenola u mikroinkapsuliranim ekstraktima bila je znatno niža (od 5 do 8 mg GAE g<sup>-1</sup> kuglica). Ovakve velike razlike u koncentracijama polifenola autori pripisuju mogućim interakcijama između alginata i spojeva prisutnih u uzorku. Naime, postoji mogućnost da ove interakcije stvore snažniju barijeru između inkapsuliranog ekstrakta i medija te tako djelomično ometu otpuštanje aktivnih tvari iz mikrokapsula. Primjenom DPPH i FRAP metode, potvrđena je i niža antioksidacijska aktivnost u inkapsuliranim ekstraktima. Ipak, razlika u izmjerenim vrijednostima nije bila tako drastična kao kod TPC-a.

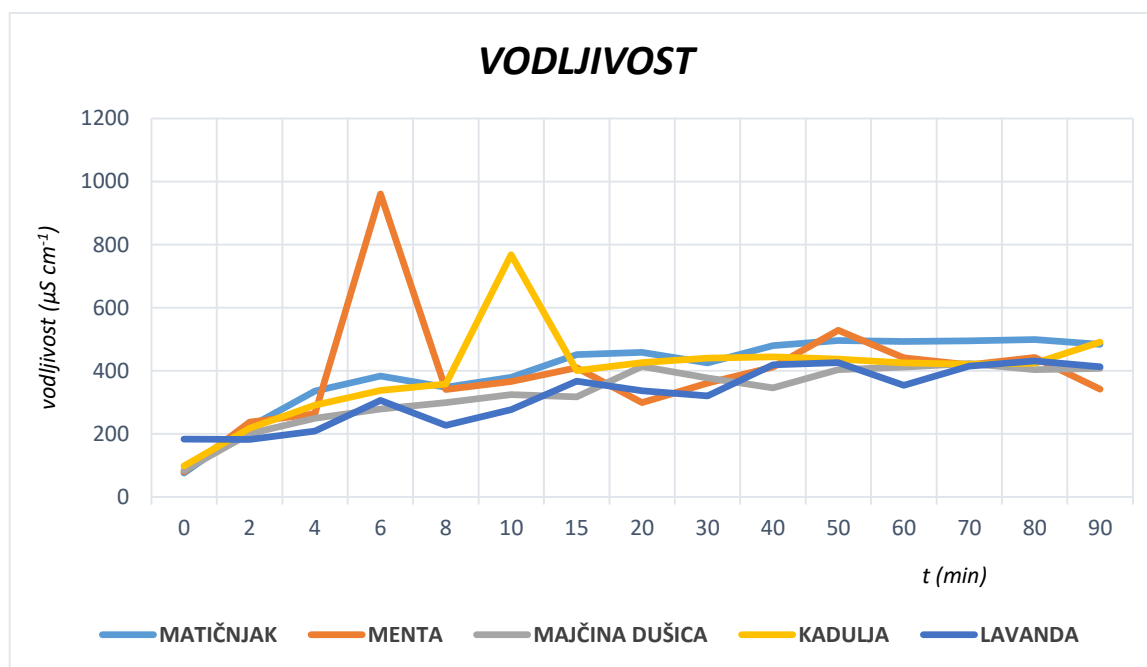
Kao vanjski materijal, alginat je korišten i u drugim istraživačkim radovima za inkapsulaciju biljnih ekstrakata, među njima i ekstrakta vrste *Pterospartum tridentatum* (Isailović i sur., 2012). Usporedbom dobivenih vrijednosti za TPC, potvrđeno je da mikroinkapsulirani ekstrakti imaju manji udio polifenola (0,24 mg GAE g<sup>-1</sup> kuglica) u odnosu na tekuće ekstrakte (0,35 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Nadalje, DPPH metodom je inkapsuliranom ekstraktu određena manja antioksidacijska aktivnost u odnosu na tekući ekstrakt, što se također podudara s rezultatima ovog rada.

#### 4.3. OTPUŠTANJE AKTIVNIH TVARI IZ MIKROKAPSULA

Otpuštanje aktivnih tvari iz mikrokapsula analizirano je u vremenskom periodu od 90 minuta. U određenim vremenskim intervalima (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 70, 80 i 90 minuta) izuzimao se manji volumen vodenog medija u koji su mikrokapsule bile dodane. Uzorcima je potom određivana ukupna količina otopljenih tvari (slika 7), vodljivost (slika 8), ukupan sadržaj polifenola (slika 9), te antioksidacijska aktivnost primjenom DPPH (slika 10) i FRAP metode (slika 11). Ovisnost promjena vrijednosti navedenih parametara o vremenu prikazana je grafički u nastavku.



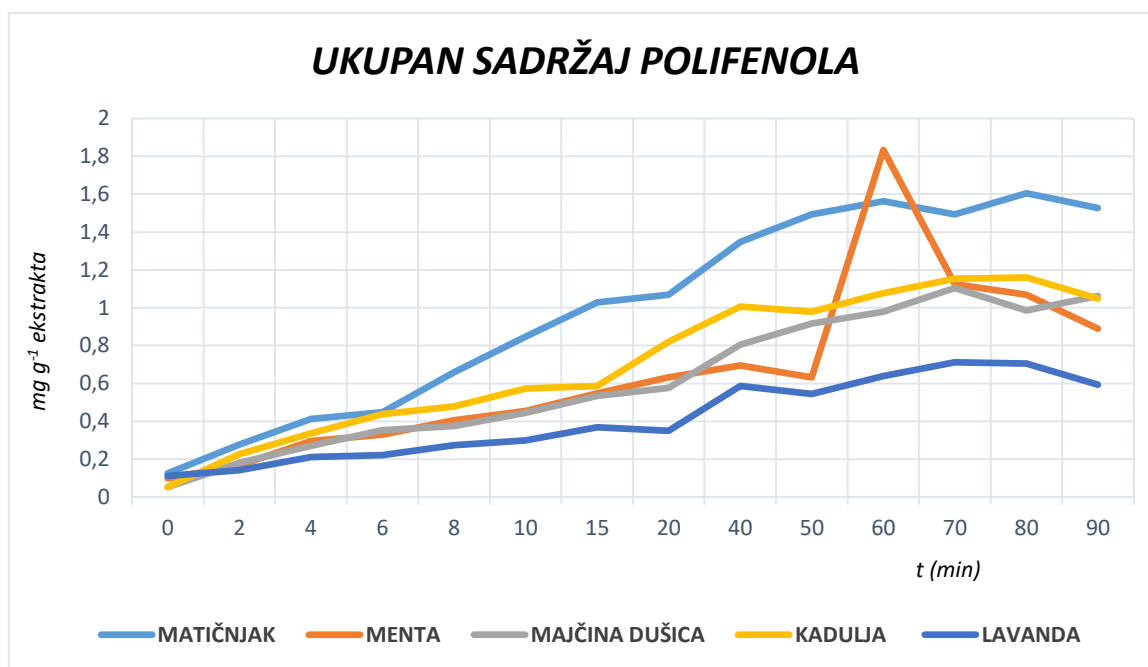
**Slika 7.** Grafički prikaz promjene koncentracije ukupnih otopljenih tvari u vodenom mediju od trenutka dodavanja mikroinkapsuliranog biljnog ekstrakta.



**Slika 8.** Grafički prikaz promjene vodljivosti vodenog medija od trenutka dodavanja mikroinkapsuliranog biljnog ekstrakta.

Izmjerene vrijednosti za vodljivost vjerno prate trend kretanja koncentracije ukupnih otopljenih tvari. Raspon koncentracija otopljenih tvari za  $t=0$  iznosio je od  $38,2 \text{ mg L}^{-1}$  (ekstrakt matičnjaka) do  $92,2 \text{ mg L}^{-1}$  (ekstrakt kadulje) (slika 7). U istoj je točki vremena vodljivost varirala od  $76,5$  do  $184,1 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  (slika 8). Postupan rast vrijednosti prisutan je kod svih uzoraka do određenog trenutka; za matičnjak i lavandu je to nakon 6 minuta, za majčinu dušicu nakon 10, za mentu nakon 15, a za kadulju nakon 40 minuta. Kod ekstrakta mente i kadulje relativno je kasno zabilježen pad vrijednosti, što je zadovoljavajuće. Međutim, na grafičkom prikazu otpuštanja aktivnih tvari za navedene uzorke vidljive su nepravilnosti ( $t=6$  za mentu i  $t=10$  za kadulju). Ova su odstupanja posljedica greške u izvođenju koraka u eksperimentu. Naime, u tim je slučajevima, prilikom izuzimanja uzorka zahvaćena i površina alginatne kuglice, što je uzrokovalo prijenos određene količine tvari i dijela kapsule u otopinu za analizu te posljedično povišenje vrijednosti za TDS i vodljivost.

Maksimalna koncentracija otopljenih tvari u ekstraktu mente ( $273 \text{ mg L}^{-1}$ ) izmjerena je već nakon 50, a u ekstraktu majčine dušice ( $211 \text{ mg L}^{-1}$ ) nakon 70 minuta. Krivulje za lavandu i matičnjak svoj maksimum dosežu nakon 80 minuta ( $216$  i  $251 \text{ mg L}^{-1}$ ), a za kadulju na samome kraju ( $245 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ranije objašnjena odstupanja su zanemarena. Najbolju je vodljivost imao ekstrakt mente ( $529 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ ), zatim ekstrakt matičnjaka ( $499 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ ) i kadulje ( $491 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ ). Kod preostala dva biljna ekstrakta, izmjerene vrijednosti bile su nešto niže ( $431 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  za lavandu i  $423 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  za majčinu dušicu).



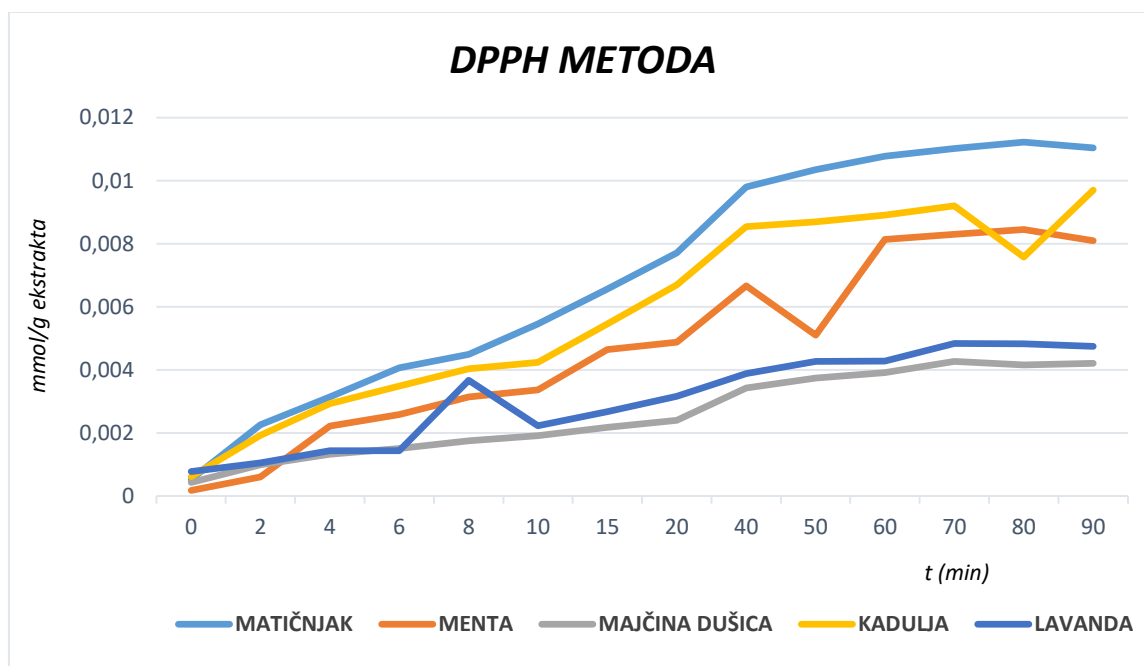
**Slika 9.** Grafički prikaz promjene koncentracije polifenolnih spojeva u vodenom mediju od trenutka dodavanja mikroinkapsuliranog biljnog ekstrakta.

Najveći je rast uočen kod krivulje koja predstavlja matičnjak, što znači da je njegov inkapsulirani oblik otpustio najviše polifenolnih tvari (slika 9). Istovremeno je najmanji rast zabilježen kod uzorka lavande. Kod preostalih je triju uzoraka koncentracija otpuštenih polifenola slična tijekom prvih 40 minuta. Pravilan rast koncentracije polifenola otpuštenih iz mente ovdje završava i prestaje pratiti trend rasta krivulja za majčinu dušicu i kadulju. Na desnoj je polovici grafa primjetno odstupanje u trendu rasta narančaste krivulje (ekstrakt mente). Ova je nagla promjena posljedica eksperimentalne pogreške pri analizi vodenog uzorka izuzetog u vremenskoj točki  $t=60$ . Maksimalne izmjerene vrijednosti za svaki biljni ekstrakt iznosile su: 1,60 (matičnjak), 1,16 (kadulja), 1,12 (menta), 1,10 (majčina dušica) i 0,71  $\text{mg g}^{-1}$  ekstrakta (lavanda). Isti je poredak zabilježen mjerenjem sadržaja polifenola u supernatantu mikrokapsula (Tablica 6).

U radu Stojanović i sur. (2012) ispitivao se utjecaj vrste mikroinkapsulacije pomoću alginata na svojstva ekstrakta majčine dušice. U sklopu istoga, proveden je test otpuštanja aktivnih tvari iz mikrokapsula. Uzorcima su određeni sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost. Izmjerene vrijednosti za polifenole i antioksidacijski potencijal bile su u korelaciji; zabilježen je njihov brz rast te stagniranje već nakon deset minuta, kada vrijednosti dosežu svoj maksimum. Međutim, u ovom je radu zabilježen rast koncentracije polifenola iz majčine dušice sve do isteka 70 minuta od početka provođenja testa otpuštanja aktivnih tvari (slika 9). Također, u prvih deset minuta nije bilo otpušteno niti 50 % ukupnog sadržaja polifenola iz

mikrokapsula majčine dušice. Razlike u rezultatima mogu se pripisati primjeni različitih postupaka u inkapsuliranju ekstrakta. Naime, Stojanović i suradnici proizveli su alginatne mikrokapsule ekstruzijom u električnom polju, dok su u ovom radu iste proizvedene kapanjem, to jest, običnom ekstruzijom.

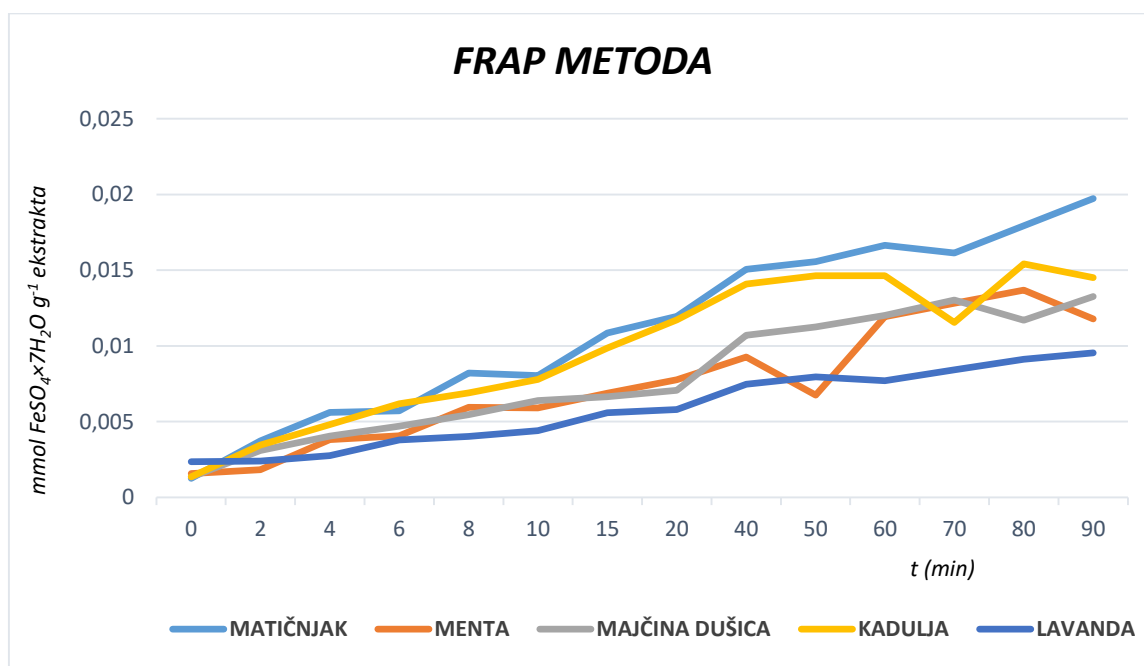
Belščak-Cvitanović i sur. (2011) također su u vodenom mediju provodili analizu otpuštanja aktivnih tvari iz inkapsuliranih ekstrakata. Kao uzorke su koristili koprivu, stolisnik, glog, bršljan te lišće masline i maline. Prema rezultatima koje su grafički prikazali, većina aktivnih tvari je bila otpuštena iz mikrokapsula tijekom prvih 20 minuta. Najveća je količina polifenola otpuštena iz mikrokapsula maline, a najmanja iz masline, što je uočeno i prilikom mjerenja udjela polifenola u početnim vodenim ekstraktima. Korelacija između koncentracije polifenola u tekućim ekstraktima i one izmjerene tijekom testa otpuštanja aktivnih tvari opažena je i u ovome radu.



**Slika 10.** Grafički prikaz promjene antioksidativne aktivnosti vodenog medija od trenutka dodavanja mikroinkapsuliranog biljnog ekstrakta. Navedene vrijednosti dobivene su primjenom DPPH metode.

Maksimalan antioksidacijski potencijal mikro kapsule majčine dušice pokazuju nakon 70 (0,0043 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta), a matičnjaka nakon 80 minuta (0,0112 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta) (slika 10). Blagi pad antioksidacijske aktivnosti, prilikom mjerenja apsorbancije, zabilježen je nakon 50 minuta za mentu te nakon 80 minuta za kadulju. Do neočekivanog rasta vrijednosti dolazi kod ekstrakta lavande već nakon 8 minuta. Budući da sve tri navedene krivulje nakon ovih odstupanja nastavljaju trend pravilnog rasta, može se zaključiti da je do odstupanja došlo zbog greške u uzorkovanju prilikom provedbe metode.

Najveći antioksidacijski potencijal uzorak lavande doseže nakon 70, mente nakon 80, a kadulje nakon 90 minuta. Mikroinkapsulirani ekstrakt matičnjaka pokazao je najveću antioksidacijsku aktivnost (0,0112 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Slijede ga kadulja s 0,0097 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta i menta s izmjerenih 0,0084 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta. Najslabiju antioksidativnu moć, prema DPPH metodi, pokazale su mikro kapsule lavande (0,0048 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta) i majčine dušice (0,0043 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta).



**Slika 11.** Grafički prikaz promjene antioksidativne aktivnosti vodenog medija od trenutka dodavanja mikroinkapsuliranog biljnog ekstrakta. Navedene vrijednosti dobivene su primjenom FRAP metode.



Inkapsulirani se matičnjak i ovdje dokazao kao uzorak s najvećom antioksidacijskom aktivnošću ( $0,0197 \text{ mmol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O g}^{-1}$  ekstrakta) (slika 11). Najviša vrijednost mu je izmjerena na samome kraju, nakon 90 minuta izlaganja vodenome mediju. U istom trenutku i ekstrakt lavande doseže svoj maksimum ( $0,0095 \text{ mmol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O g}^{-1}$  ekstrakta) koji je ponovno niži u odnosu na sve druge testirane biljne vrste. Narančasta krivulja (rezultati dobiveni za mentu) ima sličan trend rasta kao i kod mjerenja DPPH metodom (slika 10); opažen je isti pad vrijednosti na  $t=50$  i ponovni rast do maksimuma ( $0,0137 \text{ mmol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O g}^{-1}$  ekstrakta) na  $t=80$ . Mikrokapsule kadulje otpustile su najviše antioksidativnih tvari nakon 80 minuta ( $0,0154 \text{ mmol FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O g}^{-1}$  ekstrakta), a majčine dušice nakon 90 ( $0,0133 \text{ FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O mmol g}^{-1}$  ekstrakta). Usporedbom navedenih maksimalnih vrijednosti s onima dobivenim za koncentraciju polifenola (slika 9), uočava se isti poredak: matičnjak > kadulja > menta > majčina dušica > lavanda.

Prema Bušić i sur. (2018), veličina mikrokapsula i koncentracija  $\text{CaCl}_2$  korištenog pri inkapsuliranju također utječu na otpuštanje aktivnih sastojaka. Tako su upotrebom 2 %-tnog (u odnosu na 3 %-tni)  $\text{CaCl}_2$  proizvedene mikrokapsule veće, što rezultira vremenski duljim otpuštanjem aktivnih tvari iz istih. U ovom je radu korištena isključivo 2 %-tna otopina  $\text{CaCl}_2$ , zbog čega su proizvedene mikrokapsule relativno velike pa su najviše vrijednosti za antioksidacijsku aktivnost izmjerene kasnije u odnosu na rezultate testova otpuštanja aktivnih tvari drugih autora (Belščak-Cvitanović i sur., 2017; Belščak-Cvitanović i sur., 2015).

U prethodno istaknutom istraživanju određivao se strukturni oblik alginata i drugih biopolimera pogodnih za inkapsulaciju ekstrakta maslačka (Bušić i sur., 2011). Test otpuštanja je proveden izlaganjem alginatnih kapsula medijima s pH vrijednošću želuca, odnosno tankog crijeva, bez dodatka probavnih enzima. Nakon inkubacije mikrokapsula u mediju pH vrijednosti od 1,2, a zatim i 7,4, izuzetim su alikvotima određivane antioksidacijska aktivnost i sadržaj polifenola. Antioksidacijska aktivnost je pratila kretanje koncentracije polifenola; tako su njihove vrijednosti bile više nakon izlaganja crijevnim nego želučanim uvjetima. Razlog je tome što niski pH ne destabilizira kapsule alginata, dok se pri povišenim pH vrijednostima kalcijevi ioni zamjenjuju ionima natrija iz simulirane otopine (crijeva) pa se alginatna struktura raspada.

#### 4.4 USPOREDBA *in vitro* PROCESA PROBAVE ČISTIH EKSTRAKATA I MIKROKAPSULA

##### 4.4.1. Kemijska svojstva tekućih i mikroinkapsuliranih biljnih ekstrakata nakon simulacije probave

U ovom se istraživanju provodila simulacija probavnog sustava koji se sastoji od tri dijela: usne šupljine, želuca i tankog crijeva. Uvjeti su simulirani podešavanjem temperature medija na 37 °C, mijenjanjem pH vrijednosti pri prelasku iz jednog dijela sustava u drugi te dodavanjem probavnih enzima karakterističnih za svaki odjeljak. Nakon prolaska kroz simulirano tanko crijevo, izuzet je uzorak za svaki biljni ekstrakt (tekući i mikroinkapsulirani). Uzorcima se spektrofotometrijski određivao sadržaj polifenola (TPC) te antioksidacijska aktivnost (DPPH i FRAP metoda). Tablice 7 i 8 daju prikaz usporedbe navedenih vrijednosti s vrijednostima određenim prije probave. Rezultati dobiveni analizom početnih uzoraka (ekstrakata ili mikro kapsula) označeni su kao "nula" te odgovaraju rezultatima navedenim u Tablici 2 (tekući ekstrakti) odnosno Tablici 6 (inkapsulirani ekstrakti). "Crijeva" predstavljaju vrijednosti određene ispitivanjem probavljenih uzoraka.

**Tablica 7.** Usporedba kemijskih svojstava tekućih biljnih ekstrakata prije (nula) i neposredno nakon probave (crijeva). Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ .

TEKUĆI EKSTRAKT	TPC (mg GAE g <sup>-1</sup> ekstrakta)		DPPH (mmol TE g <sup>-1</sup> ekstrakta)		FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> ekstrakta)	
	nula	crijeva	nula	crijeva	nula	crijeva
<b>matičnjak</b>	73,7500 ±1,7678 <sup>a</sup>	1,2604 ±0,0295 <sup>a</sup>	0,5756 ±0,0213 <sup>a</sup>	0,0033 ±0,0008 <sup>a</sup>	0,8059 ±0,0047 <sup>a</sup>	0,0126 ±0,0003 <sup>a</sup>
<b>menta</b>	45,4167 ±1,7678 <sup>b</sup>	0,9583 ±0,0737 <sup>b</sup>	0,4712 ±0,0425 <sup>b</sup>	0,0019 ±0,0003 <sup>b</sup>	0,5327 ±0,0237 <sup>b</sup>	0,0106 ±0,0008 <sup>b</sup>
<b>majčina dušica</b>	38,7500 ±0,5893 <sup>c</sup>	0,9167 ±0,0737 <sup>b</sup>	0,3595 ±0,0019 <sup>c</sup>	0,0016 ±0,0004 <sup>b</sup>	0,5006 ±0,0325 <sup>c</sup>	0,0089 ±0,0005 <sup>c</sup>
<b>kadulja</b>	51,2500 ±2,9463 <sup>d</sup>	0,8906 ±0,0663 <sup>b</sup>	0,4156 ±0,0090 <sup>d</sup>	0,0022 ±0,0002 <sup>c</sup>	0,6329 ±0,0230 <sup>d</sup>	0,0119 ±0,0012 <sup>a</sup>
<b>lavanda</b>	22,5000 ±7,0711 <sup>e</sup>	0,6354 ±0,0000 <sup>c</sup>	0,2370 ±0,0180 <sup>e</sup>	0,0010 ±0,0007 <sup>b</sup>	0,4397 ±0,0020 <sup>e</sup>	0,0081 ±0,0014 <sup>c</sup>

**Tablica 8.** Usporedba kemijskih svojstava mikroinkapsuliranih biljnih ekstrakata prije (nula) i neposredno nakon probave (crijeva). Različita slova iznad vrijednosti u istom stupcu predstavljaju značajne razlike pri  $p < 0,05$ .

INKAPSULIRANI EKSTRAKT	TPC (mg GAE g <sup>-1</sup> kuglica)		DPPH (mmol TE g <sup>-1</sup> kuglica)		FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> ekstrakta)	
	nula	crijeva	nula	crijeva	nula	crijeva
<b>matičnjak</b>	0,58646 ±0,01620 <sup>a</sup>	0,05312 ±0,00000 <sup>a</sup>	0,00227 ±0,00004 <sup>a</sup>	0,00045 ±0,00000 <sup>a</sup>	0,00616 ±0,00017 <sup>a</sup>	0,00083 ±0,00000 <sup>a</sup>
<b>menta</b>	0,37167 ±0,01414 <sup>b</sup>	0,04417 ±0,00000 <sup>b</sup>	0,00324 ±0,00003 <sup>b</sup>	0,00021 ±0,00000 <sup>b</sup>	0,00415 ±0,00036 <sup>b</sup>	0,00058 ±0,00003 <sup>b</sup>
<b>majčina dušica</b>	0,25417 ±0,01178 <sup>c</sup>	0,05208 ±0,00000 <sup>a</sup>	0,00188 ±0,00011 <sup>c</sup>	0,00029 ±0,00000 <sup>b</sup>	0,00394 ±0,00032 <sup>c</sup>	0,00071 ±0,00002 <sup>c</sup>
<b>kadulja</b>	0,51333 ±0,02357 <sup>d</sup>	0,04167 ±0,00000 <sup>b</sup>	0,00346 ±0,00000 <sup>d</sup>	0,00009 ±0,00000 <sup>c</sup>	0,00566 ±0,00005 <sup>d</sup>	0,00067 ±0,00009 <sup>c</sup>
<b>lavanda</b>	0,18750 ±0,04125 <sup>e</sup>	0,03229 ±0,00000 <sup>c</sup>	0,00085 ±0,00001 <sup>e</sup>	0,00018 ±0,00000 <sup>d</sup>	0,00295 ±0,00012 <sup>e</sup>	0,00066 ±0,00008 <sup>c</sup>

Sukladno očekivanjima, vrijednosti nakon probave višestruko su se smanjile za svih deset vrsta uzoraka. Ova je promjena posljedica degradacije antioksidansa uslijed izlaganja uvjetima koji vladaju u gastrointestinalnom sustavu (pH, probavni enzimi, žučne soli). Od tekućih ekstrakata, najveći je pad koncentracije polifenola uočen kod matičnjaka (sa 73,75 na 1,2604 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta; Tablica 7), a od inkapsuliranih kod kadulje (s 0,51333 na 0,04167 mg GAE g<sup>-1</sup> kuglica; Tablica 8). Kod istih je ekstrakata zabilježen i najveći pad antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom (s 0,8059 na 0,0126 mmol FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> ekstrakta za matičnjak te s 0,00566 na 0,00067 mmol FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> kuglica za kadulju).

DPPH metoda je također potvrdila najveću razliku u izmjerenim vrijednostima za inkapsulirani ekstrakt kadulje (pad s 0,00346 na 0,00009 mmol TE g<sup>-1</sup> kuglica). Suprotno rezultatima dobivenim za TPC i FRAP, tekući ekstrakt matičnjaka se, prema DPPH metodi, pokazao kao uzorak s najmanjim padom vrijednosti nakon probave, dok je najveći pad imala menta (s 0,4712 na 0,0019 mmol TE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Navedeni padovi u vrijednostima su veći što je biljni ekstrakt osjetljiviji na djelovanje probavnih enzima i promjenu pH. Uvidom u rezultate dobivene za tekuće ekstrakte, nije moguće točno odrediti koji od njih je imao

najmanji pad u vrijednostima, odnosno najveći stupanj očuvanja. Svaka je metoda pokazala drugačije rezultate. Tako je prema izmjerenom TPC-u najmanji pad imala lavanda, prema DPPH metodi matičnjak, dok je za FRAP to bila menta. Analize inkapsuliranih ekstrakata su dale međusobno dosljednije rezultate pa se kao uzorak s najmanjim padom vrijednosti pokazala lavanda.

Zanimljivo je primijetiti da je najveći stupanj očuvanja, od inkapsuliranih uzoraka, imao onaj s najmanjim izmjerenim udjelom polifenola i antioksidacijskom aktivnosti prije probave (lavanda; Tablica 6), dok je, od tekućih ekstrakata, uzorak koji je prije probave pokazao najviše izmjerene vrijednosti za TPC, DPPH i FRAP, imao najveći pad (matičnjak; Tablica 1). Negativnu korelaciju između antioksidacijske aktivnosti u uzorcima prije i stabilnosti uzoraka tijekom probave *in vitro* uočila je i Marić (2017). Tamo se vodeni ekstrakt kadulje, koji je prije probave imao najniže izmjerene vrijednosti za TPC i FRAP, pokazao najstabilnijim uzorkom. Istovremeno se majčina dušica, kojoj je na početku izmjerena najviša koncentracija polifenola i najveća antioksidacijska aktivnost, pokazala najmanje stabilnom prilikom simulirane probave.

Usporedbom razlika u vrijednostima izmjerenim prije i nakon probave (Tablice 7 i 8), primjetno je da je kod tekućih ekstrakata pad prilično veći. Iz navedenog se može zaključiti da je inkapsulacija uspješno zaštitila polifenolne i druge antioksidativne tvari u biljnim ekstraktima.

#### 4.4.2. Postotak preživljavanja spojeva s antioksidacijskom aktivnošću

Kako bi se pojednostavnila usporedba probavljivosti tekućih i inkapsuliranih ekstrakata, računa se postotak preživljavanja. U tu su svrhu korištene vrijednosti prikazane u Tablici 7 i 8. Omjer vrijednosti za TPC, DPPH ili FRAP nakon ("crijeva) i prije simulirane probave ("nula) množi se brojem 100 kako bi se dobio postotak. Izračunati postotci pokazuju koliko je polifenola i drugih antioksidativnih spojeva iz određenog biljnog ekstrakta nakon probave dostupno za apsorpciju (Tablica 9).

**Tablica 9.** Postotak preživljavanja polifenola i ostalih antioksidansa u tekućim i mikroinkapsuliranim biljnim ekstraktima nakon *in vitro* simulacije probave.

EKSTRAKT	POSTOTAK PREŽIVLJAVANJA (%)					
	TPC		DPPH		FRAP	
	tekući	inkapsulirani	tekući	inkapsulirani	tekući	inkapsulirani
<b>matičnjak</b>	1,71	9,06	0,57	19,94	1,57	13,50
<b>menta</b>	2,11	11,88	0,40	6,48	2,00	14,08
<b>majčina dušica</b>	2,36	20,49	0,45	15,37	1,77	18,11
<b>kadulja</b>	1,74	8,12	0,53	2,47	1,88	11,87
<b>lavanda</b>	2,82	17,22	0,41	21,45	1,83	22,37

Postotak preživljavanja ispitivanih spojeva za tekuće je biljne ekstrakte iznosio od 0,40 do 2,82, ovisno o metodi i vrsti biljke (Tablica 9). Prema rezultatima TPC-a, najmanji je postotak preživljavanja imao matičnjak (1,71 %), a najveći lavanda (2,82 %). Kod DPPH metode, vrijednosti su se kretale od 0,40 % za mentu do 0,53 % za kadulju. FRAP metoda je, pak, pokazala da je najmanje preživjelih antioksidansa bilo u ekstraktu matičnjaka (1,57 %), a najviše u ekstraktu mente (2,00 %). Kod inkapsuliranih ekstrakata postotak preživljavanja varira od 2,47 % do čak 22,37 % (Tablica 9). Sve tri metode pokazale su najmanji stupanj preživljavanja za inkapsuliranu kadulju: 2,47 % (DPPH), 8,12 % (TPC) i 11,87 % (FRAP). Prilikom mjerenja promjera mikrokapsula, ranije je utvrđeno da su se jedino mikrokapsule kadulje smanjile nakon adsorpcije. Do smanjivanja je vjerojatno došlo zbog uranjanja alginatnih mikrokapsula u hipertoničnu otopinu ekstrakta. Moguće je da je ta razlika utjecala i na sadržaj polifenola, a time i na antioksidacijsku aktivnost inkapsuliranog ekstrakta biljke.

Najveći postotak preživljavanja kod TPC-a pokazala je inkapsulirana majčina dušica (20,49 %), dok je za DPPH metodu to bio matičnjak (19,94 %), odnosno lavanda (22,37 %) za FRAP. Izračun prema vrijednostima dobivenim DPPH metodom dao je najniže postotke preživljavanja, kako kod tekućih, tako i kod mikroinkapsuliranih ekstrakata. U odnosu na tekuće, mikroinkapsulirani ekstrakti su, bez iznimke, pokazali veći stupanj preživljavanja. Tako se koncentracija antioksidativnih tvari dostupnih za apsorpciju mikroinkapsulacijom povećala i do deset puta.

Nekoliko je ranijih istraživanja također bilo usmjereno ka povećanju bioiskoristivosti polifenola iz čaja putem inkapsulacije. Kao uzorak se najčešće koristio zeleni čaj zbog opće poznatog pozitivnog utjecaja na zdravlje ljudi. Ovaj je učinak posljedica visokog sadržaja polifenola, posebice katehina (Zokti i sur., 2016). Pročišćeni ekstrakti katehina su dostupni na tržištu, međutim, njihova cijena premašuje kupovnu moć većine građana. Stoga je 2016. godine provedeno istraživanje u kojemu se ispitala učinkovitost mikroinkapsulacije ekstrakta ovog čaja. Korištena je metoda sušenja raspršivanjem, a ekstrakt je bio obložen različitim materijalima: maltodekstrinom, arapskom gumom, kitozanom i njihovim kombinacijama u različitim omjerima. Proveden je *in-vitro* test probavljivosti mikrokapsula, kao i običnog tekućeg ekstrakta čaja. Rezultati za TPC i DPPH metodu su pokazali da je, bez obzira na to kojim je spojem ekstrakt oblagan, mikroinkapsulirani oblik imao veću bioiskoristivost od tekućeg ekstrakta (Zokti i sur., 2016).

Tri godine ranije istraživao se utjecaj konzumacije mikroinkapsuliranog ekstrakta zelenog čaja na zdravstveno stanje štakora na visoko fruktoznoj dijeti (Hee Jung i sur., 2013). Dijeta je, nakon samo osam tjedana, kod štakora uzrokovala obilježja metaboličkog sindroma: hipertenziju, hiperglikemiju, dislipidemiju i centralnu pretilost. Hipertrigliceridemija je nastala kao posljedica pretjerane proizvodnje lipida u jetri, a oksidativni stres u organizmu se povećao zbog smanjene aktivnosti katalaze u jetri i bubrezima. Potom je jednoj grupi štakora kao tretman davan tekući ekstrakt zelenog čaja, a drugoj mikroinkapsulirani. Nije bilo razlike u njihovom učinku na ukupni kolesterol i trigliceride u krvi: oba su tretmana dala podjednako uspješne rezultate. Međutim, mikroinkapsulirani ekstrakt je znatnije snizio razinu mokraćne i slobodnih masnih kiselina u krvi te povećao razinu jetrene katalaze (Hee Jung i sur., 2013). Istraživanje tako potvrđuje da je antioksidativni potencijal mikrokapsula snažniji od potencijala tekućeg ekstrakta, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovome radu.

Ispitivanjem učinka mikroinkapsuliranih, odnosno tekućih ekstrakata na zdravlje eksperimentalnih životinja bavili su se i Obidike i Emeje (2011). Kao uzorak su koristili etanolni ekstrakt lišća vrste *Entada africana*, biljke iz porodice graška. Ova je biljna vrsta karakteristična za područje Gane i sjeverne Nigerije, gdje se koristi kao antiseptik kod rana i kožnih infekcija. U navedenom je radu ispitivano njezino antiulcerozno djelovanje. Kao vanjski materijal za mikroinkapsulaciju korišten je alginat, a postupak je proveden primjenom ekstruzije. Eksperimentalne životinje su bile podijeljene u nekoliko skupina te im je davan tekući, odnosno inkapsulirani ekstrakt biljke. Potom je svima dan 1 mL čistog etanola, koji inače kod štakora potiče nastanak ulkusa. Nakon ingestije, štakori su anestetizirani, kirurški im je otvoren želudac te su promatrane lezije. Analizom životinjskog tkiva, utvrđeno je da je inhibicija ulkusa od strane tekućeg ekstrakta iznosila 54,55 %, dok je za mikroinkapsulirani ekstrakt izračunata vrijednost od čak 81,82 %. Navedena je studija, kao i ona Hee Jung i sur. (2013), od posebne važnosti jer je jedna od rijetkih koja koristi *in vivo* metodu.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Od tekućih ekstrakata analiziranih biljnih vrsta, najvišu koncentraciju polifenola i najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je ekstrakt matičnjaka, dok su za ekstrakt lavande izmjerene vrijednosti za navedene parametre bile najniže.
2. Provođenjem TPC, DPPH i FRAP metode na tekućim ekstraktima nakon adsorpcije, izmjerene su niže vrijednosti u odnosu na početni ekstrakt.
3. Tijekom izlaganja vodenom mediju, najveću količinu polifenola otpustile su mikrokapsule matičnjaka, dok je najniža koncentracija istih otpuštena iz kapsula lavande. Navedeni je odnos potvrđen i vrijednostima dobivenim za antioksidacijsku aktivnost primjenom FRAP metode, dok su kod DPPH metode najmanju količinu antioksidativnih tvari otpustile mikrokapsule majčine dušice.
4. Od tekućih ekstrakata, najmanju je stabilnost tijekom *in vitro* probave pokazao matičnjak, dok je od inkapsuliranih ekstrakata to bila kadulja.
5. Najveću stabilnost tijekom *in vitro probave* imala je inkapsulirana lavanda, dok su za tekuće ekstrakte dobiveni oprečni rezultati.
6. U odnosu na tekuće, mikroinkapsulirani su ekstrakti pružili dodatnu zaštitu bioaktivnih spojeva koji su zbog toga pokazali veći stupanj preživljavanja tijekom probave *in vitro*.



## 6. LITERATURA

Aprotosoae, A. C., Răileanu, E., Trifan A., Cioancă, O. (2013) The polyphenolic content of common *Lamiaceae* species available as herbal tea products in romanian pharmacies. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* **117** (1), 233-237.

Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta , D., Lalaoui, K. (2009) Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *Am-Euroas. J. Sci. Res.* **4** (2), 93-96.

Balakrishnan, A. (2015) Therapeutic uses of peppermint—a review. *J. Pharm. Sci. & Res.* **7** (7), 474-476.

Bansode, S. S., Banarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., Thorat, R. M. (2010) Microencapsulation: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **1** (2), 38-43.

Belščak-Cvitanović, A., Jurić, S., Đorđević, V., Barišić, L., Komes, D., Ježek, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2017) Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. *Int. J. Food Prop.* **20** (9), 1971-1986.

Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Karlović, S., Djaković, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Ježek, D. (2015) Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllum. *Food Chem.* **167**, 378-386.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44** (4), 1094-1101.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239** (1), 70-76.

Blažeković, B. Vladimir-Knežević, S., Brantner, A. Bival Štefan, M. (2010) Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka': a comparative study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules.* **15** (9) 5971-5987.

- Brezovec, N., Carović, K., Kolak, I., Britvec, M., Šatović, Z. (2006) Opis i procjena svojstava primki ljekovitog matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) Hrvatske banke biljnih gena. *Sjemenarstvo*. **23** (1), 57-66.
- Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Kovač, V., Špoljarić, I., Mršić, G., Komes, D. (2018) Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Res. Int.* **111**, 244-255.
- Chang, S. K. (2019) How food structure and processing affect the bioavailability of nutrients and antioxidants. U: Encyclopedia of Food Chemistry (Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P., ured.), Academic Press, Amsterdam, str. 158-166.
- Chu, C. J., Kemper, K. J. (2001) Lavender (*Lavandula* spp.). Boston: Longwood Herbal Task Force.
- Cvetković, A.-M., Jurina, T., Valinger, D., Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Gajdoš Kljusurić, J. (2018) The estimation of kinetic parameters of the solid-liquid extraction process of the lavender flower (*Lavandula x hybrida* L.). *Croat. J. Food Sci. Technol.* **10** (1), 64-72.
- Čančarević, A., Bugarski, B., Šavikin, K., Zdunić, G. (2013) Biološka aktivnost vrsta *Thymus vulgaris* i *Thymus serpyllum* i njihovo korišćenje u etnomedicini. *Lek. Sirov.* **33**, 3-17.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M. (2009) Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* **57** (5), 1768–1774.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalinić, V. (2014) *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of *Lamiaceae* phenolic extracts: a correlation study. *Food Technol. Biotechnol.* **52** (1), 119-127.
- Ghorbani, A., Esmaeilzadeh, M. (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.* **7** (4), 433-440.

- Hee Jung, M., Seong, P.N., Kim, M. H., Myong, N.-H., Chang, M.-J. (2013) Effect of green tea extract microencapsulation on hypertriglyceridemia and cardiovascular tissues in high fructose-fed rats. *Nutr. Res. Pract.* **7** (5), 366-372.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53** (6), 1841-1856.
- Hur, S. J., Ou Lim, B., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011) *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem.* **125** (1), 1-12.
- Isailović, B., Kalušević, A., Žuržul, N., Coelho, M. T., Đorđević, V., Alves, V. D., Sousa, I., Moldão-Martins, M., Bugarski, B., Nedović, V. A. (2012) Microencapsulation of natural antioxidants from *Pterospartum tridentatum* in different alginate and inulin systems. Proceedings of 6th Central European Congress on Food. CEFood, Novi Sad, str. 1075-1081.
- Jasso de Rodríguez, D., Puente-Romero, G. N., Díaz-Jiménez, L., Rodríguez-García, R., Ramírez-Rodríguez, H., Villarreal-Quintanilla, J. A., Flores-López, M. L., Carrillo-Lomelí, D. A., Genisheva, Z. A. (2019) *In vitro* gastrointestinal digestion of microencapsulated extracts of *Flourensia cernua*, *F. microphylla* and *F. retinophylla*. *Ind. Crops. Prod.* **138**, 1-7.
- Jianu, C., Pop, G., Gruia, A. T., Horhat, F. G. (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in western Romania. *Int. J. Agric. Biol.* **15** (4), 772-776.
- Jurinjak Tušek, A., Marić, L., Benković, M., Valinger, D., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J. (2020) *In-vitro* digestion of the bioactives originating from the *Lamiaceae* family herbal teas: A kinetic and PLS modeling study. *J. Food Biochem.* e13233. doi: 10.1111/jfbc.13233.
- Kapp, K., Hakala, E., Orav, A., Pohjala, L., Vuorela, P., Püssa, T., Vuorela, H., Raal, A. (2013) Commercial peppermint (*Mentha x piperita* L.) teas: antichlamydial effect and polyphenolic composition. *Food Res. Int.* **53** (2), 758-766.
- Katalinić, V., Miloš, M., Kulišić, T., Jukić, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **94** (4), 550-557.

- Kennedy, D. O., Scholey, A. B., Tildesley, N. T. J., Perry, E. K., Wesnes, K. A. (2002) Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72** (4), 953-964.
- Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., Gulcin, I. (2011) Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *J. Med. Plants Res.* **5** (2), 217-222.
- Marić, L. (2017) Stabilnost vodenih ekstrakata samoniklog bilja tijekom simulacije probavnog sustava *in vitro*. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Miere, F., Teusdea, A. C., Laslo, V., Fritea, L., Moldovan, L., Costea, T., Uivarosan, D., Vicas, S. I., Pallag, A. (2019) Natural polymeric beads for encapsulation of *Stellaria media* extract with antioxidant properties. *Mater. Plast.* **56** (4), 671-679.
- Mihailovic-Stanojevic, N., Belščak-Cvitanović, A., Grujić-Milanović, J., Ivanov, M., Jovović, Đ., Bugarski, D., Miloradović, Z. (2013) Antioxidant and antihypertensive activity of extract from *Thymus serpyllum* L. in experimental hypertension. *Plant Foods Hum. Nutr.* **68** (3), 235–240.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Mènard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014) A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* **5** (6), 1113-1124.
- Morović, M. (2018) Flavonoidi – metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23** (2), 182-186.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014) Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Ind. Crops. Prod.* **52**, 183-190.

- Obidike, I. C., Emeje, M. O. (2011) Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of *Entada africana* leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* **137** (1), 553-561.
- Ogawa, Y., Donlao, N., Thuengtung, S., Tian, J., Cai, Y., Reginio Jr., F. C., Ketnawa, S., Yamamoto, N. Tamura, M. (2018) Impact of food structure and cell matrix on digestibility of plant-based food. *Curr. Opin. Food Sci.* **19**, 36-41.
- Ondrejovič, M., Kraic, F., Benkovičová, H. Šilhár, S. (2012) Optimisation of antioxidant extraction from lemon balm (*Melissa officinalis*). *Czech J. Food Sci.* **30** (4), 385-393.
- Ozidal, T., Yalcinkaya, İ. E., Toydemir, G., Capanoglu, E. (2019) Polyphenol-protein interactions and changes in functional properties and digestibility. U: Encyclopedia of Food Chemistry (Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P., ured.), Academic Press, Amsterdam, str. 566-577.
- Prusinowska, R., Śmigielski, K. B. (2014) Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. *Herba Pol.* **60** (4), 56-66.
- Saad, R., Asmani, F., Saad, M., Hussain, M., Khan, J., Kaleemullah, M., Bin Othman, N., Tofigh, A., Yusuf, E. (2015) A new approach for predicting antioxidant property of herbal extracts. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **7** (1), 166-174.
- Sevindik, M., Akgul, H., Pehlivan, M., Selamoglu, Z. (2017) Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresenius Environ. Bull.* **26** (7), 4757-4763.
- Shanaida, M., Golembiovska, O., Hudz, N., Wiczorek, P. P. (2018) Phenolic compounds of herbal infusions obtained from some species of the *Lamiaceae* family. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* **31** (4), 194-199.
- Siosemarde, M., Kave, F., Pazira, E., Sedghi, H., Ghaderi, S. J. (2010) Determine of constant coefficients to relate total dissolved solids to electrical conductivity. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **46**, 258-260.
- Spencer, J. P. E. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **133** (10), 3255S-3261S.
- Stažić, E. (2019) Optimiranje procesa mikroinkapsulacije industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

- Stojanović, R., Belščak-Cvitanović, A., Manojlović, V., Komes, D., Nedović, V., Bugarski, B. (2012) Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J. Sci. Food Agric.* **92** (3), 685-696.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Satora, P., Michalik, J. (2009) Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technol. Biotechnol.* **47** (4) 456-463.
- Thach, N. A., Thuy, N. M. (2019) Study of characteristics of total polyphenols, total flavonoids and S-allyl cysteine-loaded alginate nanoparticles with various black garlic extracts and alginate ratios. *IJERST.* **8** (6), 261-272.
- Thuengtung, S., Ogawa, Y. (2019) Effects of interactions between antioxidant phytochemicals and coexisting food components in their digestibility. U: Encyclopedia of Food Chemistry (Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P., ured.), Academic Press, Amsterdam, str. 656-660.
- Walle, T., Browning, A. M., Steed, L. L., Reed, S. G., Walle, U. K. (2005) Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J. Nutr.* **135** (1), 48-52.
- WebMD (2018) Thyme <<https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-823/thyme>>. Pristupljeno 5. lipnja 2020.
- Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., Chen, F. (2006) A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* **97** (4), 705–711.
- Zokti, J. A., Sham Baharin, B., Mohamed, A. S. (2016) Green tea leaves extract: microencapsulation, phytochemical and storage stability study. *Molecules.* **21** (8), 1-24.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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



---

Ivana Sarić