

# Razvoj inkapsulacijskih sustava ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.) i njihova inkorporacija u bombonske proizvode

---

Doroci, Shefkije

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:839532>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-06**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Shefkije Doroci

7805/PT

**RAZVOJ INKAPSULACIJSKIH SUSTAVA  
EKSTRAKTA DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) I  
NJIHOVA INKORPORACIJA U BOMBONSKE  
PROIZVODE**

ZAVRŠNI RAD

**Znanstveno istraživački projekt:** Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda (IP-2019-045879)

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

Zagreb, 2022.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## RAZVOJ INKAPSULACIJSKIH SUSTAVA EKSTRAKTA DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) I NJIHOVA INKORPORACIJA U BOMBONSKE PROIZVODE Shefkije Doroci, 0058215841

### Sažetak:

Prehrambeni proizvodi se sve više obogaćuju bioaktivnim sastojcima, posebice polifenolima. Budući da su polifenoli nestabilni spojevi, prilikom inkorporacije u proizvode inkapsuliraju se kako bi se zaštitila antioksidacijska svojstva i omogućilo kontrolirano i kontinuirano otpuštanje tijekom probave. Cilj rada bio je razviti inkapsulacijske sustave ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.) primjenom ionskog geliranja i inkapsulacije liposomima te njihovom kombinacijom. Kombinirani inkapsulacijski sustav inkorporiran je u bombone (10 %) s ekstraktom dobričice i uspoređen s bombonima bez inkapsulata. Spektrofotometrijskim analizama bombonima je određen udio polifenola i antioksidacijski kapacitet (ABTS i DPPH), a primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) udio ružmarinske kiseline, kao dominantnog polifenola, te je praćeno oslobađanje u simuliranoj gastro-intestinalnoj probavi.

Bomboni s inkapsulatom imali su viši udjel ukupnih polifenola (0,82 mg EGK g<sup>-1</sup>), ružmarinske kiseline (41,53 µg g<sup>-1</sup>) i antioksidacijskog kapaciteta (4,60 i 5,33 µmol Trolox g<sup>-1</sup>) te su omogućili željenu simuliranu probavu ružmarinske kiseline, u odnosu na bombone bez inkapsulata.

**Ključne riječi:** biljni proteini, dobričica, inkapsulacija, liposomi, polifenoli

**Rad sadrži:** 33 stranica, 6 slika, 4 tablice, 55 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Danijela Šeremet, mag.ing.

**Datum obrane:** 16. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### DEVELOPMENT OF ENCAPSULATION SYSTEMS CONTAINING GROUND IVY (*Glechoma hederacea* L.) EXTRACT AND INCORPORATION INTO CANDIES Shefkije Doroci, 0058215841

#### Abstract:

Food products are increasingly enriched with bioactive compounds, especially polyphenols. Polyphenols, as unstable compounds, are encapsulated during incorporation into products to protect antioxidant properties and ensure controlled and continuous release during digestion. Aim of thesis was to develop encapsulation systems with ground ivy extracts (*Glechoma hederacea* L.) using ionic gelation, liposomal encapsulation, and their combination. Combined encapsulation system was incorporated into candies (10 %) with ground ivy extract and compared to candies without encapsulate. Using spectrophotometric analyses, total phenolic content and antioxidant capacity (ABTS and DPPH) were determined, while the content of rosmarinic acid, abundant polyphenol, was determined using high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). Its release was followed during simulated gastro-intestinal digestion.

Candies with encapsulate had higher total phenolic content (0,82 mg GAE g<sup>-1</sup>), rosmarinic acid (41,53 µg g<sup>-1</sup>) and antioxidant capacity (4,60 and 5,33 µmol Trolox g<sup>-1</sup>). They provided desirable simulated digestion of rosmarinic acid, whereas candies without encapsulate didn't.

**Keywords:** encapsulation, ground ivy, liposomes, plant proteins, polyphenols

**Thesis contains:** 33 pages, 6 figures, 4 tables, 55 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

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

**Thesis defended:** September 16<sup>th</sup>, 2022.

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1. Dobričica ( <i>Glechoma hederacea</i> L.).....   | 2         |
| 2.2. Polifenolni spojevi .....  | 2         |
| 2.3. Inkapsulacija .....  | 4         |
| 2.3.1. Ionsko geliranje.....  | 4         |
| 2.3.2. Liposomalna inkapsulacija.....   | 6         |
| 2.4. Bombonski proizvodi .....  | 8         |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>10</b> |
| 3.1. Materijali .....   | 10        |
| 3.1.1. Uzorci.....  | 10        |
| 3.1.2. Reagensi .....   | 10        |
| 3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor .....  | 11        |
| 3.2. Metode .....   | 12        |
| 3.2.1. Priprema ekstrakta.....  | 12        |
| 3.2.2. Ionsko geliranje.....  | 12        |
| 3.2.3. Priprema liofilizata za liposomalnu inkapsulaciju .....  | 13        |
| 3.2.4. Inkapsulacija liposomima .....   | 13        |
| 3.2.5. Oblaganje liposoma polimerima .....  | 13        |
| 3.2.6. Inkorporacija inkapsulacijskog sustava u bombone.....  | 14        |
| 3.2.7. Karakterizacija bioaktivnog sastava bombona.....   | 14        |
| 3.2.7.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....  | 15        |
| 3.2.7.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....  | 16        |
| 3.2.7.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....   | 17        |
| 3.2.7.4. Određivanje udjela ružmarinske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke<br>djelotvornosti .....       | 18        |
| 3.2.8. Simulacija gastro-intestinalne probave .....   | 20        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>23</b> |
| 4.1. Bioaktivna karakterizacija bombona.....  | 23        |
| 4.2. Profil otpuštanja ružmarinske kiseline iz inkapsulacijskih sustava i bombona s<br>ekstraktom dobričice ..... | 24        |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE</b> .....  | <b>27</b> |

## 1.UVOD

Prehrana predstavlja jedan od najvažnijih aspekata života jer utječe na zdravlje čovjeka, uključujući sve životne aktivnosti. Obzirom na to, danas se u prehrambenoj industriji sve više pozornosti pridaje razvoju inovativnih funkcionalnih proizvoda. Ovisno o vrsti prehrambenog proizvoda, inovativnost može predstavljati smanjena energijska, a povećana nutritivna vrijednost, korištenje alternativnih sladila kako bi proizvod bio pogodan konzumaciji za dijabetičare, biorazgradiva ambalaža i sl. U tu svrhu razvijaju se brojne recepture i primjenjuju različite tehnike, među kojima je posebice zanimljiva i tehnika inkapsulacije.

Svrha inkapsulacije je očuvati i omogućiti kontrolirano i kontinuirano otpuštanje aktivne tvari koja je inkapsulirana. U prehrambenoj industriji to su najčešće različiti bioaktivni sastojci poput polifenola, vitamina, mineralnih tvari i dr. Polifenoli posjeduju jaka antioksidacijska svojstva te stoga djeluju preventivno u razvoju kardiovaskularnih, neurodegenerativnih bolesti i različitih karcinoma. Međutim, izrazito su nestabilni, osjetljivi na vanjske čimbenike, kao što su svjetlost, pH i toplina zbog čega često dolazi do njihove degradacije i prije nego što se unesu u organizam. Ovisno o primjeni inkapsuliranih sustava razvijene su različite inkapsulacijske tehnike, kao što je ekstruzija, emulgiranje, oblaganje u fluidiziranom sloju, sušenje raspršivanjem, liposomalna inkapsulacija, koacervacija i sl.

U ovom radu inkapsuliran je ekstrakt biljke dobričice koja je bogata različitim bioaktivnim spojevima, među kojima se ističu polifenoli. Razvijena su tri inkapsulacijska sustava ekstrakta dobričice – hidrogel čestice, liposomi te liposomi obloženi biopolimerima, pri čemu je ovaj zadnji sustav bio inkorporiran u bombonske proizvode. Profil otpuštanja ružmarinske kiseline, kao najdominantnijeg polifenolnog spoja dobričice, praćen je u simuliranim gastro-intestinalnim uvjetima kako bi se potvrdila učinkovitost inkapsulacije i sposobnost kontroliranog i kontinuiranog otpuštanja nakon inkorporacije u bombonske proizvode. Također, bioaktivna karakterizacija (određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet) formuliranih bombonskih proizvoda provedena je primjenom spektrofotometrijske i kromatografske metodologije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Dobričica (*Glechoma hederacea* L.)

Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*). Latinsko ime *Glechoma* potječe od grčke riječi *glechon*, što je bio naziv za mirisnu metvicu (*Mentha pulegium*), a dan je zbog sličnosti biljke. Ime vrste *hederacea* znači „nalik na bršljan“. Dobričica prirodno raste na prostoru Europe, Azije, Sjeverne Amerike i Novog Zelanda na vlažnim i hranjivim zemljištima (Hutchings i Price, 1999). Stabljika dobričice je duguljasta, četverbridna, isprepletana, pužu po tlu i naraste do pola metra dužine. Listovi su nasuprotni, bubrežastog su oblika, nazubljeni tupim, okruglastim rubovima, na licu su tamnozeleni i sjajniji, a naličje je svjetlije. Cvjetovi su skupljeni po 3-4 u pršljenovima, vjenčić je ljubičast, prašnika ima 4. Cvatu od travnja do kolovoza. Plod je kalavac koji se raspada na 4 smeđa oraščića. Razmnožava se sjemenom, ali i zakorijenjivanjem novih stabljika čime stvara nove kolonije (Hutchings i Price, 1999). Dobričica se tradicionalno koristi u Aziji i Europi za liječenje gastritisa, bronhitisa, dijareje, bolesti jetre, a njeni ekstrakti nanose se i na kožu za liječenje različitih vrsta kožnih bolesti (Grabowska, 2022). Njeni osušeni listovi koriste se i kao začim. Neka su istraživanja pokazala da spojevi dobričice imaju antiupalnu, antioksidativnu, antimikrobnu i antimutagensku aktivnost (Gwiazdowska i sur., 2022; An i sur., 2006). Dobričica ima raznovrstan i vrlo bogat kemijski sastav, u kojem su, između ostaloga, identificirani polifenolni spojevi, terpenoidi, alkaloidi, steroidi i masne kiseline (Chao i sur., 2021). Polifenolni spojevi smatraju se odgovornima za poželjna antioksidacijska svojstva kod biljaka, a nastaju kao sekundarni metaboliti tijekom rasta biljke ili kao odgovor na stres (infekcija, ozljeda, UV zračenje) (Mareček i sur., 2017).

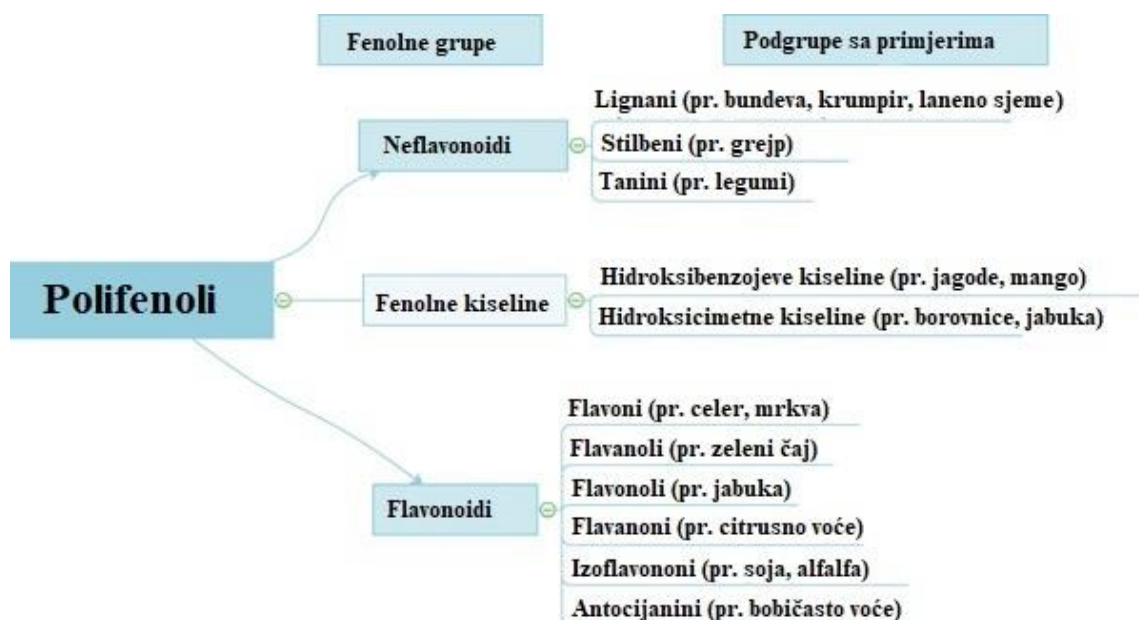
### 2.2. Polifenolni spojevi

Polifenoli se klasificiraju kao sekundarni metaboliti sintetizirani isključivo u biljkama s različitim strukturama i funkcijama. Vrlo često se kao sinonim za „fenolne spojeve“ koristi izraz „polifenolni spojevi“, ali polifenolni spojevi podrazumijevaju strukturu s najmanje dva fenolna prstena. Prema najnovijoj definiciji, polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji potječu isključivo iz fenilpropanoida sintetiziranih od šikimata i/ili poliketidnih putova koji sadrže više od jednog fenolnog prstena lišenih bilo koje funkcionalne skupine koja se temelji na dušiku u njihovom najosnovnijem strukturnom izrazu (Quideau i sur., 2011). Nalaze se najviše u voću, povrću, zelenom čaju i cjelovitim žitaricama (Singla i sur., 2019). Prema

podjeli prikazanoj na Slici 1. polifenoli se dijele na flavonoide i neflavonoide. Fenolne kiseline spadaju u neflavonoidne spojeve, a karakteristične su po karboksilnoj grupi povezanoj na benzenski prsten. Dobivaju se iz benzojeve i cimetine kiseline. Primjeri hidroksibenzojevih kiselina su galna, *p*-hidrokibenzojeva i vanilinska kiselina, a hidroksicimetnih su kafeinska, ferulinska, sinapinska i *p*-kumarinska kiselina. U voću i povrću najčešće se nalaze slobodne fenolne kiseline, dok su u žitaricama vezane fenolne kiseline (Durazzo i sur., 2019).

Flavonoidi se dijele na antocijanine, flavanole, flavanone, flavonole, flavonone i izoflavonone. Flavonoidi su najrasprostranjeniji polifenoli spojevi u prirodi te imaju antioksidativno, antibakterijsko i antiupalno djelovanje. Flavanoni se povezuju sa smanjenim rizikom dijabetesa i pretilosti, a najpoznatiji je naringinin koji se nalazi u citrusnom voću. Katehin je pripadnik flavanola, a u najvišoj se koncentraciji nalazi u čaju (Durazzo i sur., 2019).

U neflavonoide spadaju lignani, stilbeni i tanini. Stilbeni su karakteristični u svojoj strukturi po dva fenolna prstena povezana sa dvije metilenske skupine. Najpoznatiji je resveratrol koji se nalazi u grožđu, kikirikiju i bobičastom voću. Lignani su spojevi koji su građeni od dviju propilbenzenskih jedinica. Najčešće se nalaze u legumima, sjemenkama i biljnom ulju (Singla i sur., 2019). Konzumacija namirnica bogatih polifenolima povezuje se sa smanjenim rizikom kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, povišenog krvnog tlaka i raka (Durazzo i sur., 2019).



Slika 1. Klasifikacija polifenola (prema Basheer i Kerem, 2015)



## **2.3. Inkapsulacija**

Inkapsulacija predstavlja fizikalno-kemijski ili mehanički proces u kojem određeni materijal okružuje tvar i pri tome se stvaraju čestice veličine raspona od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara (Chavarri i sur., 2012). Tvar koja se oblaže najčešće čini neka tekućina, ali može biti i čvrsta čestica ili plin. Ona se najčešće naziva jezgra, unutarnja faza, punjenje ili aktivno sredstvo. Tvar u koju se inkapsulira naziva se nosač, ljuska, vanjska faza, membrana ili matriks (Risch i Reineccius, 1995). Sve češće se u prehrambenoj industriji inkapsuliraju biološki aktivni spojevi kao što su vitamini, minerali, polifenoli, probiotici, omega-3-masne kiseline i fitosteroli. Takvi su spojevi osjetljivi na svjetlinu, kisik, vodu ili toplinu. Stoga je nužno osigurati stabilnost tih spojeva tijekom procesiranja i za vrijeme skladištenja. Nakon konzumacije proizvoda sa inkapsulatom, biološke komponente prolaze kroz gastro-intestinalni sustav te se metaboliziraju, a svrha inkapsulacije jest njihovo kontrolirano i kontinuirano otpuštanje. Isto tako, potrebno je osigurati da inkorporacija inkapsulata ne narušava organoleptička i kvalitativna svojstva proizvoda (Đorđević i sur., 2015).

Da bi sustav za inkapsulaciju i prijenos bioaktivnih komponenata bio učinkovit kada se inkorporira u prehrambeni proizvod, on mora zadovoljavati sljedeće tehnološke uvjete: (1) bioaktivne komponente moraju biti inkapsulirane u matriks sa visokom fizikalno-kemijskom stabilnošću i minimalnim utjecajem na organoleptička svojstva; (2) sastojci koji se koriste za inkapsulaciju moraju biti visoke kvalitete, a po mogućnosti prirodni; (3) jezgra ne smije doći u dodir sa ostalim sastojcima hrane i mora biti sačuvana od negativnog utjecaja svjetla, temperature ili pH; (4) mora biti osigurano kontrolirano otpuštanje inkapsuliranog spoja ovisno o uvjetima okoline; i (5) inkapsulacija mora biti lako primjenjiva u industrijskoj proizvodnji (Đorđević i sur., 2015).

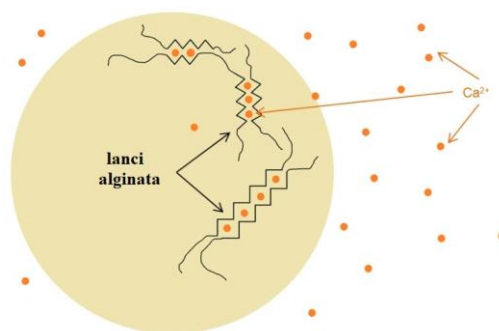
Osim biološki aktivnih spojeva, u prehrambenoj industriji se često inkapsuliraju zaslađivači, pojačivači okusa, kiseline, bojila, konzervansi te tvari neugodnog okusa ili mirisa. Zaslađivač aspartam često se inkapsulira i ugrađuje u žvakaće gume (Gibbs i sur., 1999).

### **2.3.1. Ionsko geliranje**

Ionsko geliranje je inkapsulacijska tehnika koju karakteriziraju niski troškovi, za njenu izvedbu nije potrebna posebna oprema te se ne koriste visoke temperature i organska otapala. Može se provoditi atomizacijom, ekstruzijom ili koekstruzijom (ukapavanjem) (Kurozawa i Hubinger, 2017). Polimerna ili hidrokolooidna otopina ukapava se u otopinu dvokationskih iona uz

konstantno miješanje. Aktivna tvar koja se inkapsulira otopljena je u polimernoj otopini. Kada kapljica polimerne otopine dođe u kontakt sa otopinom iona, odmah se stvaraju sferične čestice koje sadrže aktivnu tvar unutar polimernog matriksa (Kurozawa i Hubinger, 2017). Drugim riječima, do geliranja dolazi kada se kationi počnu vezati za polimerne lance nosača tvoreći trodimenzionalnu mrežu. Na Slici 2. prikazan je postupak inkapsulacije u kojem nosač čini alginat, a sredstvo za umrežavanje čine kalcijevi ioni.

Jedna od najjednostavnijih metoda provodi se ukapavanjem pod utjecajem gravitacije. Veličina čestica bit će određena masom kapljice i površinske napetosti kao i promjerom otvora igle. Prosječan promjer nastale hidrogel čestice iznosi oko 2 mm. Proces ukapavanja traje dugo tako da se ta metoda ne primjenjuje u industriji (Chavarri i sur., 2012).



**Slika 2.** Inkapsulacija aktivnog sredstva pomoću otopine alginata i kalcijevih iona (*prema Chavarri i sur., 2012*)

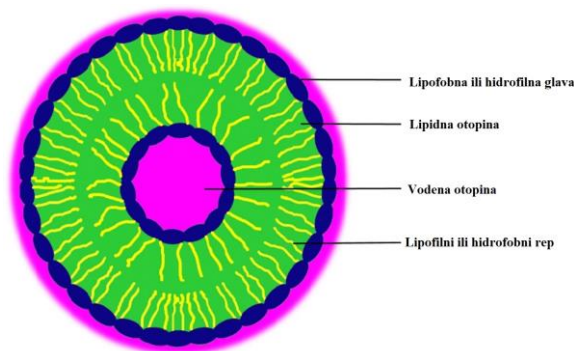
Materijali koji se koriste kao nosači najčešće su alginat, nisko metilirani pektin, hitin, kitozan, a kao sredstvo za umrežavanje najčešće se koriste kalcijevi ioni. Takva tehnika se koristi za inkapsulaciju hidrofobnih spojeva ili spojeva sa niskom topljivosti. Inkapsulacija polarnih spojeva nije pogodna jer se tada teško postiže dobro odvajanje faza između jezgre i matriksa. Takva inkapsulacija rezultira sa manjom inkapsulacijskom učinkovitošću te slabom kontrolom otpuštanja aktivne tvari (Kurozawa i Hubinger, 2017).

Alginat je biopolimer koji se često koristi zbog svoje biokompatibilnosti, netoksičnosti, biorazgradivosti, niske cijene i jednostavne proizvodnje. Ima široku primjenu kod inkapsulacije gdje štiti stanice, DNK, nutrijente i mikrobe. Pogodan je za postizanje ujednačenog otpuštanja okusa, minerala i drugih spojeva iz inkapsulata (Ching i sur., 2017).

### 2.3.2. Liposomalna inkapsulacija

Liposomalna inkapsulacija jedna je od novijih tehnika inkapsulacije koju su razvili istraživači kako bi mogli pratiti transport lijekova do određenog organa. Ovom metodom nastaju mikroskopske čestice, liposomi, koji su otporni na probavne enzime, lužnate otopine, probavne sokove, žučne soli i crijevnu mikrofloru te slobodne radikale. Stoga je sadržaj liposoma sačuvan od degradacije i oksidacije. Fosfolipidni sloj ostaje netaknut sve dok ne dođe do određenog mjesta, organa ili sustava u kojem se sadržaj treba otpustiti (Akbarzadeh i sur., 2013).

Struktura liposoma prikazana je na Slici 3. Liposomi su građeni od fosfolipida koji čine molekulu amfipatskom, odnosno sadrži hidrofilni (interakcija sa polarnom molekulom) i hidrofobni (interakcija sa nepolarnom molekulom) dio molekule koji joj omogućava topljivost u različitim otapalima te samim time široku primjenu (Subramani i Ganapathyswamy, 2020).



**Slika 3.** Strukturni prikaz građe liposoma (*prema* Subramani i Ganapathyswamy, 2020)

Fosfolipidi se često kombiniraju sa grupama kao što su fosfatidilserin, fosfatidilkolin, fosfatidilglicerol i fosfatidna kiselina (Subramani i Ganapathyswamy, 2020). Liposomi se mogu podijeliti u pet skupina ovisno o intracelularnoj smjesi:

- 1) Konvencionalni liposomi: Lipidni sloj liposoma građen je od fosfolipida i kolesterola koji okružuje polarni sadržaj. Takav lipidni dvosloj može proći kroz hidrofobne i hidrofilne otopine.
- 2) pH-osjetljivi liposomi: Lipidni sadržaj liposoma destabilizira se kada se vanjski pH promijeni iz neutralnog u lužnati ili kiseli.
- 3) Kationski liposomi: Liposomi sadrže jedan pozitivni naboj koji ulazi u interakciju sa negativnim nabojem ili nukleinskim kiselinama tijekom miješanja.

- 4) Imuno liposomi: Liposomi sadrže antitijela na svojoj površini.
- 5) Liposomi sa produljenom aktivnošću: Liposomi na sebi sadrže hidrofilni sloj oligosaharida, glikoproteina, polisaharida i sintetskih polimera koji produljuju aktivno djelovanje liposoma (Subramani i Ganapathyswamy, 2020).

Metoda kojom će se liposomi pripremiti ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima materijala koji će se inkapsulirati, svojstvima medija u kojoj će se liposomi disperzirati, koncentracija koja se planira inkapsulirati i njenoj toksičnosti, veličini inkapsulata i mogućnosti proizvodnje u većim količinama (*scale-up*) (Dua i sur., 2012). Postoje različiti načini pripreme liposoma, a svi oni sadrže četiri osnovna koraka:

- 1) Sušenje lipida iz organskih otapala
- 2) Disperzija lipida u vodenom mediju
- 3) Čišćenje dobivenih liposoma
- 4) Analiziranje konačnog produkta (Akbarzadeh i sur., 2013).

Razvijene su različite metode inkapsulacije liposomima, a neke od njih su sonifikacija, ekstruzija, homogenizacija pod visokim tlakom i dr.

Sonifikacija je često korištena metoda u kojoj se liposomi dispergiraju u kupelji sa kontroliranom temperaturom ili se koristi sonda koja se uranja u smjesu liposoma. Nedostatci ove metode su mala inkapsulacijska učinkovitost, moguća degradacija fosfolipida, uklanjanje većih molekula ili metalno onečišćenje nastalo od korištenja sonde (Akbarzadeh i sur., 2013). Druga metoda uključuje ekstruziju pri visokom tlaku kroz uski otvor. Metoda je jednostavna, brza i ponovljiva. Dobiveni liposomi veći su od onih nastalih sonifikacijom. Nedostatci metode su ti da je teško dostići visoku temperaturu, a radni je volumen relativno mali (maksimalno 50 mL) (Dua i sur., 2012). Homogenizacija pod visokim tlakom ima brojne prednosti kao što su veća brzina postupka, veliki proizvodni kapacitet te proizvodnja homogeniziranih čestica sa visokom fizikalnom stabilnošću. Lipidna smjesa prolazi kroz uski otvor pod visokim tlakom (100-2000 bara) što dovodi do poremećaja i nastajanja čestica veličine raspona od nekoliko milimetara do nekoliko nanometara. Homogenizacija se može provoditi pod visokom temperaturom pri čemu će nastati čestice manjih dimenzija, no tada postoji opasnost degradacije bioaktivnih komponenti. Kao odgovor na to, razvila se metoda homogenizacije pod visokim tlakom i niskom temperaturom. Otopljeni lipidi prelaze u kruto agregatno stanje primjenom tekućeg dušika ili suhog leda. Kruti se lipidi zatim usitnjavaju primjenom mehaničke sile u vrlo sitne čestice koje se potom dispergiraju u hidrofilnu otopinu surfaktanta,

a potom se primjenjuje visoki tlak kako bi se smanjila veličina čestica (Azar i sur., 2020).

#### **2.4. Bombonski proizvodi**

Prema Pravilniku o proizvodima sličnim čokoladi, krem-proizvodima i bombonskim proizvodima (NN 73/05, 69/2008 i 141/2013), bombonski i srodni proizvodi dobiveni su odgovarajućim tehnološkim postupcima od šećera, drugih sirovina, aditiva i tvari koje se dodaju radi povećanja biološke vrijednosti proizvoda. Osnovna sirovina za proizvodnju bombona su šećerne sirovine od kojih se mogu koristiti sljedeće: saharoza, glukoza, invertni šećer, škrobni sirup, laktoza i fruktoza, i zamjene za šećer – sorbitol, manitol, ksilitol, izomalt, maltitol, maltitol-sirup, laktitol i polidekstroza. Osim šećera, u bombonsku masu mogu se dodati kava, jezgričavo voće i njihove prerađevine, kandirano voće i povrće, kukuruzne i zobene pahuljice, riža, bjelančevine, sirutka u prahu, sladni ekstrakt i dr. Proizvodnja bombonskih proizvoda može zahtijevati i dodatak određenih dozvoljenih aditiva za postizanje arome i boje (prirodne ili umjetne), kiselosti (prehrambene kiseline), održavanje svježine (sorbitol, glicerol i invertaza), želiranje (agar-agar, pektin, i dr.), sredstva za konzerviranje i povećanje trajnosti proizvoda (antioksidansi i konzervansi) (Goldoni, 2004). Bombonski proizvodi izlaze na tržište kao: tvrdi (punjeni) bomboni, svileni (punjeni) bomboni, draže-bomboni, proizvodi karamele, žele-proizvodi, gumeni bomboni, rahatlokum, fondan-bomboni, likerni-bomboni, šećerne figure, komprimati, pjenasti proizvodi, lakric-bomboni, halva, marcipan-proizvodi, persipan-proizvodi, nugat-proizvodi, grilaž-proizvodi, (punjena) žvakaća guma, draže-žvakaća guma (Goldoni, 2004). Današnji trendovi u proizvodnji bombonskih proizvoda baziraju se na eliminaciji nezdravih sastojaka poput šećera i nadomještanju sa zdravijim zamjenama ili inkorporiranju aktivnih sastojaka sa funkcionalnih svojstvima. Pri razvoju funkcionalnih bombona važno je provoditi senzorske analize kako se ne bi narušila organoleptička i teksturalna svojstva bombona (Periche i sur., 2016). Konzumacija bombona često se povezuje sa nastajanjem karijesa, visokim glikemijskim indeksom i pretilošću zbog visokog sadržaja šećera. Obzirom na to, u industriji se saharoza zamjenjuje sa umjetnim sladilima, a u zadnje vrijeme sa zdravijim, prirodnim alternativama poput izomaltuloze, oligofruktoze i stevije (Periche i sur., 2016). Boja je prva značajka proizvoda koju potrošač primijeti pri kupovini. Proizvođači zbog toga najčešće koriste umjetna bojila koja daju jača obojenja, stabilnija su i jeftinija (Ghosh i sur., 2022). Međutim, neka se umjetna bojila smatraju potencijalno karcinogenim i neurotoksičnim za ljude (Amchova i sur., 2015) pa su se zato

počela koristiti prirodna bojila dobivena iz biljnih pigmentata. Pigmenti su spojevi koji biljkama daju privlačne boje, a među njima spadaju žuto-narančasti karotenoidi, zeleni klorofili, crvenoljubičasti antocijanini i betacijanini te žuti betaksantini. Obzirom na to da su osjetljivi na vanjske utjecaje poput svjetla i temperature, prirodni pigmenti imaju nisku bioraspoloživost i slabu apsorpciju, pa se zato inkapsuliraju i potom inkorporiraju u bombonske proizvode (Ghosh i sur., 2021). Bombonskim se proizvodima pokušava produljiti i rok trajanja. Istraženo je da fermentirano voće, poput datulje, može odgoditi mikrobno kvarenje i za 58 % zahvaljujući antimikrobnom djelovanju mliječne i octene kiseline (Muhialdin i sur., 2021). U Tablici 1. sažeto je prikazan pregled literature na temu funkcionalnih bombonskih proizvoda.

**Tablica 1.** Pregled funkcionalnih bombonskih proizvoda

| <b>Aktivni sastojci bombonskih proizvoda</b>                                  | <b>Utjecaj na nutritivnu kvalitetu proizvoda</b>  | <b>Referenca</b>                   |
|---|---|------------------------------------|
| <b>Banana, đumbir, obrano mlijeko u prahu, med</b>                            | Povećani udjel proteina, minerala, fenola, flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta  | Yadav i sur. (2021)                |
| <b>Inkapsulirani betanin iz indijske smokve (<i>Opuntia ficus-indica</i>)</b> | Povećanje antioksidacijskog kapaciteta  | Otálora i sur. (2019)              |
| <b>Inkapsulirani antocijanini iz rozele (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)</b>   | Povećanje udjela organskih kiselina, antocijanina, polisaharida i flavonoida  | de Moura i sur. (2019)             |
| <b>Inkapsulirani ekstrakt kore šipka</b>                                      | Povećanje udjela polifenola (punicalagin, galna i elaginska kiselina)   | Palabiyik i sur. (2018)            |
| <b>Crna malina (<i>Rubus occidentalis</i>)</b>                                | Povećanje udjela antocijanina, elagitanina, elaginske kiseline, flavonoida, ferulinske kiseline, vlakana, vitamina i minerala | Gu i sur. (2015)                   |
| <b>Tamarind (<i>Dialium indum</i> L.), stevija, ksilitol</b>                  | Smanjeni glikemijski indeks   | Samakradhamrongthai i Jannu (2021) |

### **3.EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1.Materijal**

##### **3.1.1.Uzorci**

Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) je kupljena od travara M.B. (Bjelovara, Hrvatska). Biljni materijal usitnjen je u električnom mlinu i prosijan kroz sito s otvorima veličine 450 µm pri čemu se u svim daljnjim analizama koristila frakcija veličine čestica < 450 µm.

Za ionsko geliranje korišteni su natrijev alginat (Sigma-Aldrich, SAD) i rižin protein (Nutrigold, Hrvatska), a za inkapsulaciju liposomima korišten je Phospholipon 90 G (Lipoid GmbH, Njemačka). Pri izradi bombona korišteni su agar-agar (bio&bio, Hrvatska) i ksilitol (bio&bio, Hrvatska).

##### **3.1.2.Reagensi**

- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboskilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Acetonitril, Fisher Scientific (SAD)
- Amonijev karbonat, Lach-Ner (Češka)
- Etanol, GRAM-MOL d.o.o. (Hrvatska)
- Etil-acetat, Kemika (Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Kalcijev klorid, GRAM-MOL d.o.o. (Hrvatska)
- Kalijev dihidrogen fosfat, Lach-Ner (Češka)
- Kalijev klorid, Carlo Erba Reactifs-SDS (Francuska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Njemačka)
- Klorovodična kiselina, Carlo Erba Reactifs-SDS (Francuska)
- Magnezijev klorid heksahidrat, Lach-Ner (Češka)
- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Nizozemska)
- Mravlja kiselina, Carlo Erba (Njemačka)

- Natrijev hidrogen karbonat, Lach-Ner (Češka)
- Natrijev karbonat, Kemika (Hrvatska)
- Natrijev klorid, Carlo Erba Reactifs-SDS (Francuska)
- Pankreatin (svinjski), Sigma-Aldrich (Kina)
- Pepsin (svinjski), Sigma-Aldrich (SAD)
- Ružmarinska kiselina, Sigma-Aldrich (SAD)
- Žučne soli (goveđi), Sigma-Aldrich (SAD)

### **3.1.3.Laboratorijski uređaji i pribor**

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Automatska mikropipeta, Gilson (SAD)
- Büchnerov lijevak
- Centrifuga, SL 8/8R, Thermo Scientific (Kina)
- Električni mlin
- Eppendorf tuba
- Filter papir
- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Liofilizator Christ, Alpha 1-2 LD plus (Njemačka)
- Magneti
- Magnetska miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Njemačka)
- Menzura
- Odmjerne tikvice
- Odsisna boca
- Petrijeve zdjelice
- Plastična šprica
- Propipeta
- Rotavapor (IKA RV8, Njemačka)
- Silikonski kalup
- Sito
- Spektrofotometar Helios  $\gamma$ , ThermoSpectronic (Velika Britanija)
- Staklena čaša



- Staklene epruvete
- Staklene pipete
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti Agilent 1200 Series s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom, Agilent Technologies (SAD)
- Tikvica s okruglim dnom
- Ultrazvučna kupelj, Elmasonic 2 120, Elma (Njemačka)
- Vortex, Dlab Scientific (Francuska)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema ekstrakta**

Kao otapalo za pripremu ekstrakta korištena je deionizirana voda, a omjer uzorka i otapala iznosio je 1:50 (3 g:150 mL). Ekstrakcija se provodi miješanjem na magnetskoj miješalici 30 min na temperaturi od 80 °C. Nakon završene ekstrakcije otopina je ohlađena i centrifugirana (9500 rpm, 10 min, 4 °C) kako bi se tekuća faza odvojila od krute faze. Dobiveni supernatant filtriran je vakuum filtracijom. Filtrat iz odsisne boce prebačen je kvantitativno u menzuru te je menzura dopunjena deioniziranom vodom do volumena od 150 mL.

### **3.2.2. Ionsko geliranje**

Kod pripreme otopine polimera (nosača) korišteni su alginat i rižin protein. Preliminarnim analizama utvrđeno je da optimalna koncentracija alginata koju otopina mora sadržavati iznosi 3 % (w/w), a rižinog proteina 12 % (w/w). Otopina alginata i rižinog proteina pripremljena je u ekstraktu te je ostavljena da se miješa na magnetskoj miješalici preko noći. Gelirajući medij jest 3 % (w/w) otopina kalcijeva klorida pripremljena otapanjem bezvodnog kalcijeva klorida u ekstraktu dobričice. Otopina je miješana na magnetskoj miješalici kratko vrijeme. Otopina polimera (alginat + rižini proteini) prebačena je u plastičnu špricu sa iglom (18 G) te je postavljena na pumpi iznad otopine kalcijeva klorida. Stvaranje hidrogel čestica vršilo se ukapavanjem otopine polimera u otopinu dvovalentnih kationa uz neprestano miješanje. Kada je ukapavanje završeno, čestice su miješane 10 min te potom izvađene iz otopine, isprane deioniziranom vodom i prebačene u Eppendorf tube. Čuvane su na + 4 °C u ekstraktu dobričice

do daljnjih eksperimenata.

### **3.2.3.Priprema liofilizata za liposomalnu inkapsulaciju**

Pripremljeni ekstrakt (3.2.1.) korišten je i za pripremu liofilizata dobričice za liposomalnu inkapsulaciju. Ekstrakt je koncentriran pod vakuumom koristeći rotacioni uparivač do 10x manjeg volumena te je nakon toga prebačen u Petrijeve zdjelice. Petrijeve zdjelice s koncentriranim ekstraktom pokrile su se s parafilmom na kojem su se probušile rupice. Tako pripremljeni ekstrakt stavljen je na 12 h u zamrzivač na -80 °C nakon čega je bio podvrgnut liofilizaciji kroz 24 h kako bi se dobila suha tvar ekstrakta, odnosno liofilizat, koji je korišten za liposomalnu inkapsulaciju.

### **3.2.4.Inkapsulacija liposomima**

Liposomalna inkapsulacija rađena je prema metodi opisanoj u radu Perrett i suradnika (1991). U staklenoj čaši otopi se jednaka masa Phospholipona 90 G (P90G) i etanola te se uz istovremeno miješanje na magnetskoj miješalici zagrijava na 60 °C u vodenoj kupelji sve dok se sav P90G ne otopi u etanolu (2 min). Vrh čaše prekrije se aluminijskom folijom kako bi se spriječila evaporacija etanola. Odmjerna tikvica od 50 mL napunjena je deioniziranom vodom te je iz nje uzet alikvot od 1 mL i u njemu otopljen liofilizirani ekstrakt dobričice mase 50 mg. Pripremljena otopina ekstrakta prebačena je u čašu sa P90G otopljenim u etanolu i smjesa je miješana 2 min u vodenoj kupelji (60 °C). Ostatak deionizirane vode iz odmjerne tikvice prebačen je u plastičnu špricu koja je postavljena na peristaltičku pumpu sa zadanim protokom od 50 mL h<sup>-1</sup>. Čaša je pokrivena aluminijskom folijom kako ne bi došlo do degradacije bioaktivnih spojeva pod djelovanjem svjetla.

### **3.2.5.Oblaganje liposoma polimerima**

Pripremljeni liposomi pomiješani su s otopinom alginata i rižinih proteina u ekstraktu (otopina sadrži 6 % (w/w) alginata i 24 % (w/w) rižinih proteina) u omjeru 1:1 (w/w). Tako pripremljena mješavina ukapavana je u 12 % (w/w) otopinu kalcijeva klorida. Kada je ukapavanje završeno, čestice su miješane 10 min te potom izvađene iz otopine, isprane deioniziranom vodom i prebačene u plastičnu Eppendorf tubu. Čuvane su na + 4 °C u ekstraktu dobričice do daljnjih eksperimenata.

### 3.2.6. Inkorporacija inkapsulacijskog sustava u bombone

U bombone je inkorporiran inkapsulacijski sustav nastao kombiniranjem dviju metoda: ionskog geliranja i inkapsulacije liposomima (3.2.5.). Bomboni su načinjeni od agar-agara kao želirajućeg sredstva i ksilitola kao sladila. U laboratorijskoj čaši pripremljena je 6 % (w/w) otopina agar-agara u ekstraktu dobričice miješanjem na magnetskoj miješalici (60 °C). U drugoj čaši dodano je 32,5 g ksilitola i 14,4 g ekstrakta. Smjesa je miješana (100 °C) dok se sav ksilitol nije otopio. Otopine ksilitola i agar-agara pomiješane su u jednakom omjeru te promiješane na magnetskoj miješalici na temperaturi 60 °C kako ne bi došlo do stvrdnjavanja smjese. Dobivena je bombonska smjesa mase 20 g, te je u nju dodano 2 g inkapsulata - 10 % inkapsulata. U bombonske smjese dodani su liofilizirani inkapsulati. Smjesa je lijevana u silikonske kalupe i ostavljena u hladnjak na 10 min dok se bomboni nisu stvrdnuli, a potom su izvađeni iz kalupa (Slika 4.).

Od istih otopina agar-agara i ksilitola napravljena je još jedna bombonska smjesa u koju nisu dodani inkapsulati. Smjesa je lijevana u kalupe, a bomboni su analizirani paralelno sa bombonima u kojima su ugrađeni inkapsulati.



Slika 4. Bombon sa dodanim inkapsulatom i ekstraktom dobričice

### 3.2.7. Karakterizacija bioaktivnog sastava bombona

Pripremljeni agar-agar bomboni rezani su na manje komade. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz izrezanih bombona provedena je sa 80 % (v/v) vodenom otopinom metanola u omjeru uzorak/otapalo 1:20 (w/v). Prvih 30 min ekstrakcije započinje u ultrazvučnoj kupelji snage 200 W i frekvencije 37 kHz nakon čega se ekstrakcija nastavlja na magnetskoj miješalici 15 min pri sobnoj temperaturi. Po završetku ekstrakcije, provedeno je centrifugiranje (9500 rpm, 10

min), supernatant je odvojen, a ostatak bombona ponovno je podvrgnut ekstrakciji pod istim uvjetima. Supernatanti iz obje ekstrakcije spojeni su i zatim analizirani. Na ekstraktima su provedene analize određivanja udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta i udjela ružmarinske kiseline.

### **3.2.7.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola**

#### Princip metode

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

#### Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100  $\mu\text{L}$  uzorka, 500  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne (*w/v*) otopine natrijevog karbonata te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100  $\mu\text{L}$  uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

#### Izračun

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,0010x - 0,0001$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola ( $\text{mg L}^{-1}$ )

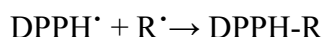
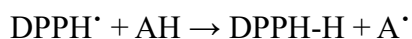
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda ( $\text{mg L}^{-1}$ ), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provodi se u dvije paralelne probe ( $n=2$ ), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g bombona.

### 3.2.7.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

#### Princip metode

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



#### Postupak rada

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. Apsorbancija te otopine mora biti  $\sim 1$ . U tamnu epruvetu se otpipetira 100  $\mu\text{L}$  uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 min po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100  $\mu\text{L}$  metanola te 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH.

#### Izračun:

Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$ , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,603x - 0,006$$

gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provodi se u dvije paralelne probe ( $n=2$ ), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u  $\text{mmol Trolox-a/g bombona}$ .

### **3.2.7.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom**

#### Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

#### Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina  $\text{ABTS}^+$  radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88  $\mu\text{L}$  (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata (persulfat) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat

reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije ABTS<sup>+</sup> radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi  $0,70 \pm 0,02$  (1 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 96%-tnim etanolom).

Volumen od 20  $\mu$ L uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 min. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 20  $\mu$ L vode pomiješa s istom količinom reagensa (2 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala).

#### Izračun:

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$ , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,303x + 0,0006$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a L<sup>-1</sup>)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L<sup>-1</sup>), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provodi se u dvije paralelne probe (n = 2), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Troloxa/g bombona.

#### **3.2.7.4. Određivanje udjela ružmarinske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti**

##### Princip metode

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performace liquid chromaography*)

– HPLC) je dominantna separacijska tehnika u analitičkoj kemiji zbog svoje sposobnosti da učinkovito razdvaja spojeve u uzorku, identificira ih, te kvantificira uz visoku preciznost (Bhardwaj i sur., 2015). Uzorak koji je u tekućem stanju, injektira se u kolonu sa poroznim materijalom (stacionarna faza), a potom se mobilna faza propušta kroz kolonu pod visokim tlakom.

### Postupak rada

HPLC analiza provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 pomoću Zorbax Extend C18 (4,6 × 250 mm, 5 μm i.d.) kolone (Agilent Technologies, SAD) spojene s PAD detektorom (engl. *photodiode array detector*). Elucija je provedena gradijentno s dvokomponentnom mobilnom fazom koja se sastojala od (A) 1% (v/v) otopine mravlje kiseline u vodi i (B) 1% (v/v) otopine mravlje kiseline u acetonitrilu prema režimu elucije prikazanom u Tablici 2. Protok je bio 1 mL min<sup>-1</sup>, volumen injektiranja 5 μL i temperatura kolone 25 °C. Ružmarinska kiselina je detektirana pomoću PAD detektora pri valnoj duljini od 320 nm. Analiza je za sve uzorke provedena u duplikatu. Svi uzorci su filtrirani kroz 0,45 μm membranski filter (Nylon Membranes, SAD) prije analize.

**Tablica 2.** Režim elucije za primijenjenu HPLC metodu

| Vrijeme (min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) | Protok (mL min <sup>-1</sup> ) |
|---------------|---------------|---------------|--------------------------------|
| 0             | 93            | 7             | 1,00                           |
| 5             | 93            | 7             | 1,00                           |
| 45            | 60            | 40            | 1,00                           |
| 47            | 30            | 70            | 1,00                           |
| 52            | 30            | 70            | 1,00                           |

Identifikacija ružmarinske kiseline provedena je usporedbom retencijskih vremena i karakterističnih apsorpcijskih spektra (190-400 nm) s komercijalnim dostupnim standardom, a kvantifikacija izradom baždarne krivulje koristeći odgovarajući standard.



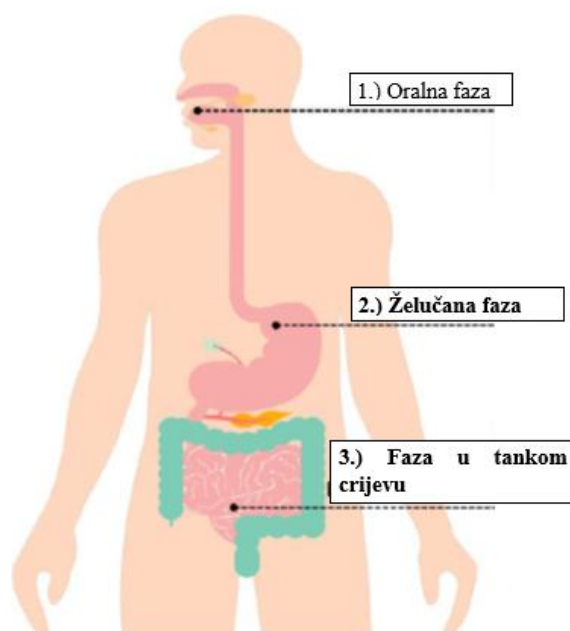
### 3.2.8. Simulacija gastro-intestinalne probave

#### Princip metode

Modeli simulacije gastro-intestinalne probave koriste se kako bi se predvidjelo ponašanje hrane i njenih komponenti u probavnom sustavu. Simulacija probave hrane sastoji se od oralne faze, želučane faze te faze u tankom crijevu. Fiziološki uvjeti prisutni u gastro-intestinalnom sustavu određuju se, između ostalog, točno određenim koncentracijama probavnih enzima, pH, vremenom digestije i koncentracijom soli (Minekus i sur., 2014).

#### Postupak rada

U ovom eksperimentu, proveden je model simulirane digestije sa dvije faze: želučane faze (SGF - engl. *simulated gastric fluid*) i faze u tankom crijevu (SIF – engl. *simulated intestinal fluid*) (Slika 5.)



**Slika 5.** Faze probave u ljudskom organizmu (prema Aylanc i sur., 2021)

Sastav SGF-a i SIF-a prikazan je u Tablici 3. Obzirom da u želucu vladaju kiseli uvjeti, pH-vrijednost SGF-a snižena je na pH 3,0 dodatkom par kapi 1 M HCl. U SIF je dodano par kapi 1 M NaOH kako bi se pH korigirao na 7,0.

**Tablica 3.** Koncentracije soli u SGF i SIF otopinama (Minekus i sur., 2014)

| Sol   | Koncentracija<br>(mmol L <sup>-1</sup> ) |      |
|---|--|------|
|   | SGF                                      | SIF  |
| KCl   | 6,9                                      | 6,8  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                   | 0,9                                      | 0,8  |
| NaHCO <sub>3</sub>                                | 25                                       | 85   |
| NaCl  | 47,2                                     | 38,4 |
| MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> | 0,1                                      | 0,33 |
| (NH <sub>4</sub> )CO <sub>3</sub>                 | 0,5                                      | /    |

Simulirana digestija provedena je s hidrogel česticama, liposomima, liposomima obloženim biopolimerima te bombonima s i bez inkapsulata. Kod bombona, uzorak je najprije izrezan na manje komadiće kako bi se postigla mastikacija do koje dolazi u oralnoj fazi.

Izvagana masa uzorka prebačena je u laboratorijsku čašu sa 50 mL SGF-a. U otopinu je ranije dodana koncentracija enzima pepsina od 2000 IU/mg. Otopina je konstantno miješana na magnetskoj miješalici (37 °C). Uzeti su alikvoti volumena 1 mL nakon 5, 15, 30, 60, 90 i 120 min. Nakon svakog uzimanja alikvota, isti volumen SGF-a je dodan u čašu. Alikvot je prebačen u staklenu epruvetu u koju je ranije dodano 2 mL 5 M NaCl, 0,25 mL 4 M HCl i 1,75 mL H<sub>2</sub>O. Sadržaj epruvete je promiješan te je dodano 5 mL etil-acetata koje služi kao organsko otapalo za provođenje ekstrakcije tekuće-tekuće. Epruveta je zatvorena plastičnim čepom, sadržaj je promiješan na vorteksu 1 min i centrifugiran kako bi se pospješilo odvajanje vodene i organske faze. Nakon odvajanja dviju faza, gornji, organski dio prebačen je u tikvicu sa okruglim dnom. Ekstrakcija je provedena još dva puta, a svi odvojeni organski dijelovi sakupljeni su u istu tikvicu. Tikvica s okruglim dnom postavljena je na rotavapor u vodenu kupelj (40 °C). Etil-acetat iz tikvice isparava pod vakuumom pri tlaku od 240 mbar i kondenzira se u koloni za kondenzaciju te ukapava u drugu okruglu tikvicu. Vakuumska evaporacija je gotova kada tikvica koja je postavljena iznutra postane suha, a u njoj ostane bijeli talog. U tikvicu se potom doda 1 mL 80 % (v/v) metanola u kojem se resuspendiraju polifenoli. Otopina je mikropipetom pipetirana u plastičnu špricu sa mikrofilterom te je iz nje prebačena u HPLC vijalu.

Nakon što je prošlo 120 minuta simulirane digestije u želučanoj fazi, uzorak je filtriran iz SGF-a i prebačen u drugu čašu u kojem se nalazi 50 mL SIF otopine. Potrebno je da se u SIF otopini

nalaze pankreatin (smjesa proteaze, lipaze i amilaze) koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  i žuči  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Sadržaj je konstantno miješan na magnetskoj miješalici ( $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Alikvot od  $1 \text{ mL}$  uzet je nakon 5, 15, 30 i 60 min te je provedena ekstrakcija kao na prethodno opisan način. Tijekom simulirane gastro-intestinalne digestije, profil otpuštanja praćen je određujući koncentraciju ružmarinske kiseline u izuzetim alikvotima prema metodi opisanoj u 3.2.7.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Bioaktivna karakterizacija bombona

Ekstrakt dobričice korišten je pri izradi dviju vrsta bombona: bez inkapsulata (BOM\_1) i s inkorporiranim liposomima obloženim biopolimerima (BOM\_2). Formuliranim bombonima određen je udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Također, obzirom da je dobričica biljka bogata polifenolima, među kojima se ističe ružmarinska kiselina (Šeremet i sur., 2020), možemo očekivati visoku koncentraciju iste te je u formuliranim bombonima pomoću HPLC-PDA metodologije određen njezin udio. Rezultati su prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4.** Karakterizacija bioaktivnih spojeva bombona sa ekstraktom dobričice

| Uzorak | Udio ukupnih polifenola (mg EGK* g <sup>-1</sup> ) | Antioksidacijski kapacitet (μmol Trolox g <sup>-1</sup> ) |             | Udio ružmarinske kiseline (μg g <sup>-1</sup> ) |
|--------|--|---|-------------|---|
|        |  | DPPH  | ABTS        |   |
| BOM_1  | 0,73 ± 0,01  | 4,13 ± 0,02   | 4,79 ± 0,04 | 38,93 ± 0,48                                    |
| BOM_2  | 0,82 ± 0,01  | 4,60 ± 0,00   | 5,33 ± 0,02 | 41,53 ± 0,77                                    |

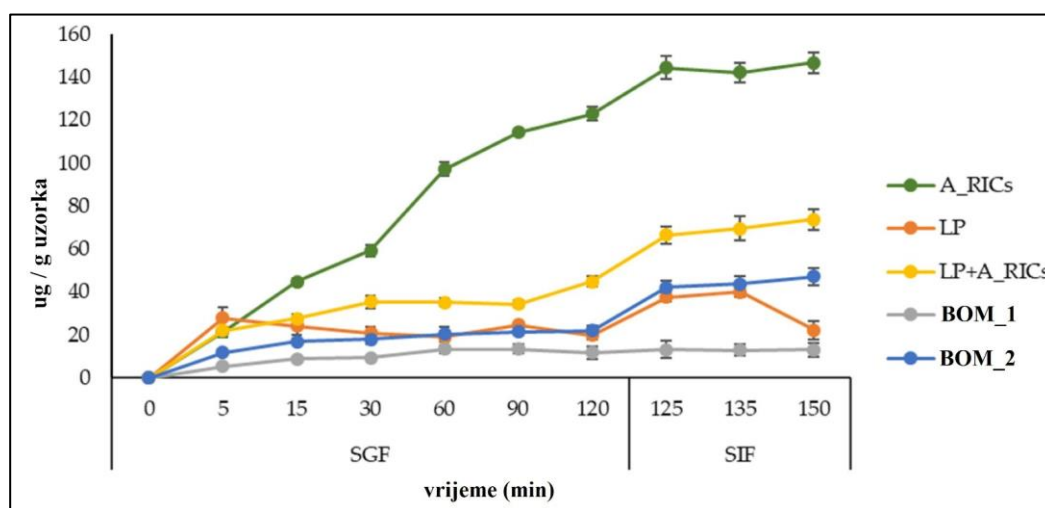
\*EGK-ekvivalenti galne kiseline

Usporedbom rezultata vidljivo je da su bomboni s inkorporiranim inkapsulatom (BOM\_2) bogatiji polifenolnim spojevima (0,82 mg EGK g<sup>-1</sup>) te da posjeduju snažniji antioksidacijski kapacitet (4,60 i 5,33 μmol Trolox g<sup>-1</sup>). Također, okarakterizirani su većim udjelom ružmarinske kiseline (41,53 μg g<sup>-1</sup>). Bombon bez inkapsulata (BOM\_1) je obogaćen ekstraktom dobričice tako da je i on pokazao značajne vrijednosti udjela ukupnih polifenola (0,73 mg EGK g<sup>-1</sup>), antioksidacijskog kapaciteta (4,13 i 4,79 μmol Trolox g<sup>-1</sup>) i udjela ružmarinske kiseline (38,93 μg g<sup>-1</sup>). U oba slučaja kod određivanja antioksidacijskog kapaciteta dobivene su veće vrijednosti ABTS metode nego DPPH. Razlog tome je što ABTS reagens reagira sa hidrofilnim i lipofilnim skupinama, dok DPPH radikal reagira samo sa hidrofilnim (Sricharoen i sur., 2015). Villanueva-Carvajal i suradnici (2013) istraživali su mogućnost dodavanja čaške biljke rozele (*Hibiscus sabdariffa* L.) bogate polifenolima i vlaknima u bombonske proizvode napravljene od želatine, pektina ili modificiranog škroba. Analizom udjela ukupnih polifenola utvrđeno je da su bomboni bogati polifenolima (1,953 mg EGK g<sup>-1</sup>) sa antioksidacijskim kapacitetom od 262,14 mmol Trolox određenog FRAP

metodom. U radu Amjadi i suradnika (2018) uspoređeni su stabilnost i antioksidacijski kapacitet betanina u gumenim bombonima s i bez nanoliposoma tokom skladištenja. Bomboni sa inkorporiranim liposomima pokazali su veću stabilnost i snažniji antioksidacijski kapacitet od bombona samo s ekstraktom betanina. Veća stabilnost može se pripisati strukturi liposoma koja štiti betanin od oksidacije i hidrolize. Uočeno je i da što je veća koncentracija betanina u bombonima, to je manja degradacija sadržaja betanina. Palabiyik i suradnici (2018) istražili su povezanost između žvakaćih guma obogaćenih inkapsuliranim ekstraktom kore šipka i dodanog šećera. Žvakaće gume s dodanom saharozom, glukoznim sirupom i glicerinom pokazale su slabiju antioksidacijsku aktivnost od žvakaćih guma sa sorbitolom. Naime, saharoza ima više hidroksilnih skupina od sorbitola, stoga se mogu očekivati veće reakcije između saharoze i polifenola. Hidroksilne skupine saharoze i polifenola ulaze u reakciju kondenzacije tvoreći glikozide i time može doći do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta.

#### 4.2. Profil otpuštanja ružmarinske kiseline iz inkapsulacijskih sustava i bombona s ekstraktom dobričice

Formulirani inkapsulati i bomboni podvrgnuti su analizi otpuštanja bioaktivnih spojeva u simuliranim gastro-intestinalnim uvjetima. Tijekom analize, pratio se udio ružmarinske kiseline pošto je ona najdominantniji polifenolni spoj dobričice (Šeremet i sur., 2020). Rezultati su prikazani na Slici 6.



**Slika 6.** Profil otpuštanja ružmarinske kiseline iz inkapsulacijskih sustava i bombona s ekstraktom dobričice u simuliranim gastro-intestinalnim uvjetima

A\_RICs-hidrogel čestice s alginatom i rižinim proteinima kao nosačima; LP-liposomi s ekstraktom dobričice; LP+A\_RICs-liposomi obloženi alginatom i rižinim proteinima; BOM\_1-bomboni bez inkapsulata; BOM\_2-bomboni s inkapsulatom

Svi analizirani inkapsulacijski sustavi (A\_RICs, LP i LP+A\_RICs) pokazali su kontrolirano i kontinuirano oslobađanje ružmarinske kiseline tijekom 120 min u SGF, nakon čega je slijedilo kontinuirano otpuštanje u SIF do 30 min. Što se tiče inkapsulata A\_RICs, veće oslobađanje ružmarinske kiseline dogodilo se u SIF-u, kao što se i očekivalo jer su mikročestice alginata relativno stabilne u kiselim otopinama i razgrađuju se pod višim pH vrijednostima (Li i sur., 2016). Ipak, u SGF-u dolazi do slabljenja mreže alginatnog hidrogela zbog istiskivanja  $Ca^{2+}$  ionskih ostataka monovalentnim kationima prisutnim u SGF (Gómez-Mascaraque i sur., 2019). Veće oslobađanje ružmarinske kiseline iz liposoma (LP) također je primijećeno u SIF-u. Nizak pH i prisutnost pepsina u SGF-u imaju mali učinak na liposome (Rowland i Woodley, 1980), dok žučne soli i pankreatin u SIF-u utječu na njihove fizikalne karakteristike i morfologiju zbog hidrolize fosfolipida enzimima pankreatina i interakcije žučnih soli sa komponentama liposoma (Liu i sur. 2012). Deterdžentska svojstva žučnih soli mogu destabilizirati fosfolipidne dvoslojeve u liposomima (Liu i sur, 2012). Slične rezultate zabilježili su Liu i suradnici (2015) gdje je cjelovitost liposoma ostala nepromijenjena tijekom probave u SGF-u, dok je do oštećenja membrana i otpuštanja slobodnih masnih kiselina, olakšano prisutnošću žučnih soli, došlo u SIF-u. Nadalje, liposomi (LP) su postigli maksimalno otpuštanje ružmarinske kiseline na 15 min u SIF-u, dok je u liposomima obloženim alginatom i rižinim proteinima kontrolirano otpuštanje produženo do 30 min. Iako su bomboni pripremljeni samo s ekstraktom dobričice (BOM\_1) pokazali snažan bioaktivni potencijal (4.1.), nisu omogućili kontrolirano i kontinuirano oslobađanje ružmarinske kiseline tijekom simulirane gastro-intestinalne probave, dok su bomboni pripremljeni s inkapsulatom (BOM\_2) omogućili željenu simuliranu probavu ružmarinske kiseline.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Bomboni pripremljeni s ekstraktom dobričice bogati su polifenolima i imaju izražena antioksidacijska svojstva, koja su viša kod bombona s 10 % inkorporiranog inkapsulata ekstrakta dobričice.
2. Inkorporacija liposoma obloženih alginatom i proteinima riža rezultirala je povećanjem udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta bombona.
3. Liposomi obloženi alginatom i proteinima riže pokazali su poželjniji profil otpuštanja ružmarinske kiseline u simuliranim gastro-intestinalnim uvjetima, u usporedbi s neobloženim liposomima.
4. Bomboni pripremljeni samo s ekstraktom dobričice nisu omogućili kontrolirano i kontinuirano oslobađanje ružmarinske kiseline tijekom simulirane gastro-intestinalne probave, dok su bomboni pripremljeni s inkapsulatom omogućili željenu simuliranu probavu ružmarinske kiseline.

## 6. POPIS LITERATURE

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Woo Joo S, Zarghami N, Hanifehpour Y. i sur. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* **8**, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>

Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J (2015) Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **73**, 914-922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>

Amjadi S, Ghorbani M, Hamishehkar H, Roufegarinejad L (2018) Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry* **256**, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.114>

An H, Jeong H, Um J, Kim H, Hong S (2006) *Glechoma hederacea* inhibits inflammatory mediator release in IFN- $\gamma$  and LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* **106**, 418-424. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.024>

Aylanc V, Tomas A, Russo-Almeida P, Falcao SI, Vilas-Boas M (2021) Assessment of bioactive compounds under simulated gastrointestinal digestion of bee pollen and bee bread: Bioaccessibility and antioxidant activity. *Antioxidants* **10**, 651. <https://doi.org/10.3390/antiox10050651>

Azar FAN, Pezeshki A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Mohammadi M (2020) Nanostructured lipid carriers: Promising delivery systems for encapsulation of food ingredients. *Journal of Agriculture and Food Research* **2**, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100084>

Bao C, Jiang P, Chai J, Jiang Y, Li D, Bao W, Liu B (2019) The delivery of sensitive food bioactive ingredients: Absorption mechanism, influencing factors, encapsulation techniques and evaluation models. *Food Research International* **120**, 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.024>

Basheer L, Kerem Z (2015) Interactions between CYP3A4 and Dietary Polyphenols. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 854014. <https://doi.org/10.1155/2015/854015>

Bhardwaj SK, Dwivedi K, Agarwal DD (2015) A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* **5**, 76-81.



Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)- Food Science and Technology* **28**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Chao W, Chan W, Ma H, Chou S (2021) Phenolic acids and flavonoids-rich *Glechoma hederacea* L. (*Lamiaceae*) water extract against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Food Biochemistry* **46**, 14032. <https://doi.org/10.1016/j.jfs.2019.05.075>

Chavarri M, Maranon I, Villaran MC (2012) Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. U: Rigobelo E (ured.) *Probiotics*, IntechOpen, London, str. 501-540.

Ching SH, Bansal N, Bhandari B (2017) Alginate gel particles-A review of production techniques and physical properties. *Food Science and Nutrition* **57**, 1133-1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>

de Moura SCSR, Berling CL, Garcia AO, Queiroz MB, Alvim ID, Hubinger MD (2019) Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. *Food Research International* **121**, 542-552. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.010>

Dua JS, Rana AC, Bhandari AK (2012) Liposome: Methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* **3**, 14-20.

Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA i sur. (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research* **33**, 2221-2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>

Dorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A (2015) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews* **7**, 452-490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>

Ghosh S, Sarkar T, Das A, Chakraborty R (2021) Micro and Nanoencapsulation of Natural Colors: a Holistic View. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **193**, 3787-3811. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03631-8>

Ghosh S, Sarkar T, Das A, Chakraborty R (2022) Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)- Food Science and Technology* **153**, 112527. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112527>

Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN (1999) Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **50**, 213-224. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>

Goldoni L (2004) Tehnologija konditorskih proizvoda, Dio 2: Bombonski proizvodi, Kugler, Zagreb, 316 str.

Gómez-Mascaraque L, Martínez-Sanz M, Hogan SA, López-Rubio A, Brodkorb A (2019) Nano- and microstructural evolution of alginate beads in simulated gastrointestinal fluids. Impact of M/G ratio, molecular weight and pH. *Carbohydrate Polymers* **223**, 115121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115121>

Grabowska K, Amanowicz K, Paško P, Podolak I, Galanty A (2022) Optimization of the Extraction Procedure for the Phenolic-Rich *Glechoma hederacea* L. Herb and Evaluation of Its Cytotoxic and Antioxidant Potential. *Plants* **11**, 2217. <https://doi.org/10.3390/plants11172217>

Gu J, Ahn-Jarvis JH, Vodovotz Y (2015) Development and Characterization of Different Black Raspberry Confection Matrices Designed for Delivery of Phytochemicals. *Journal of Food Science* **80**, 610-618. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12808>

Gwiazdowska D, Uwineza PA, Frak S, Juś K, Marchwinska K, Gwiazdowski R i sur. (2022) Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Properties of *Glechoma hederacea* Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction, Using Different Extraction Conditions. *Applied Sciences* **12**, 3572. <https://doi.org/10.3390/app12073572>

Hutchings MJ, Price EAC (1999) *Glechoma hederacea* L. (*Nepeta glechoma* Benth., *N. hederacea* (L.) Trev.). *Journal of Ecology* **87**, 347-364. <https://www.jstor.org/stable/2648325>

Kurozawa LE, Hubinger MD (2017) Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science* **15**, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.004>

Li J, Kim SY, Chen X, Park HJ (2016) Calcium-alginate beads loaded with garlic acid: Preparation and characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)- Food Science and Technology* **68**, 667-673. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.012>

Liu W, Ye A, Liu C, Liu W, Singh H (2012) Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean- derived phospholipids during in vitro digestion. *Food Research International* **48**, 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.017>

Liu W, Ye A, Liu W, Liu C, Han J, Singh H (2015) Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chemistry* **175**, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.108>

Mareček V, Mikyška A, Hampel D, Čejka P, Neuwirthova J, Malachova A i sur. (2017) ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Jornal of Cereal Science* **73**, 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>

Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C i sur. (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function* **5**, 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>

Muhialdin BJ, Marzlan AA, Kadum H, Arulrajah B, Asri NM, Fathallah S i sur. (2021) Metabolomics profiling and antimicrobial activity of fermented date fruit (Khastawi) used as functional ingredients for making Asia confectionary (Dodol). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **35**, 478-486. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1892526>

Otálora MC, Barbosa HJ, Perilla JE, Osorio C, Nazareno MA (2019) Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)- Food Science and Technology* **103**, 222-227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.074>

Ough CS, Amerine MA (1988) *Methods Analysis of Musts and Wines*, John Wiley & Sons, New York, 400 str.

Palabiyik I, Toker OS, Konar N, Gunes R, Güleri T, Alaşalvar H i sur. (2018) Phenolics release kinetics in sugared and sugar-free chewing gums: microencapsulated pomegranate peel extract

usage. *International Journal of Food Science and Technology* **53**, 2657-2663. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13862>

Periche A, Castello ML, Heredia A, Escriche I (2016) Stevia rebaudiana, Oligofructose and Isomaltulose as Sugar Replacers in Marshmallows: Stability and Antioxidant Properties. *Journal of Food Processing and Preservation* **40**, 724-732. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12653>

Perrett S, Golding M, Williams WP (1991) A Simple Method for the Preparation of Liposomes for Pharmaceutical Applications: Characterization of the Liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **43**, 154-161. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb06657.x>

Pravilnik (2005) Pravilnik o proizvodima sličnim čokoladi, krem-proizvodima i bombonskim proizvodima. Narodne novine 73, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005\\_06\\_73\\_1442.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1442.html) Pristupljeno 6. rujna 2022.

Pravilnik (2008) Pravilnik o dopuni Pravilnika o proizvodima sličnim čokoladi, krem-proizvodima i bombonskim proizvodima. Narodne novine 69, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008\\_06\\_69\\_2301.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_06_69_2301.html) Pristupljeno 6. rujna 2022.

Pravilnik (2013) Pravilnik o izmjeni pravilnika o proizvodima sličnim čokoladi, krem-proizvodima i bombonskim proizvodima. Narodne novine 141, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_11\\_141\\_3028.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_11_141_3028.html) Pristupljeno 6. rujna 2022.

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L (2011) Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 586-621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Risch SJ, Reineccius GA (1995) Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, American Chemical Society, USA. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0590>

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

Samakradhamrongthai RS, Jannu T (2021) Effect of stevia, xylitol, and corn syrup in the development of velvet tamarind (*Dialium indum* L.) chewy candy. *Food Chemistry* **352**, 129353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129353>

Silverio GB, Sakanaka LS, Alvim ID, Shirai MA, Grosso CRF (2018) Production and characterization of alginate microparticles obtained by ionic gelation and electrostatic adsorption of concentrated soy protein. *Ciencia Rural* **48**, 20180637. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180637>

Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM i sur. (2019) Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International* **102**, 1397-1400. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1397>

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**, 1179. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999b) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology* **299**, 152. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144 – 158. <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.full.pdf+html>

Sricharoen P, Techawongstein S, Chanthai S (2015) Determination of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Activities in the Crude Extracts of Ten Varieties of Tomatoes. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology* **20**, 66-74. <https://doi.org/10.14456/kkurj.2015.7>

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

Swallah MS, Sun H, Affoh R, Fu H, Yu H (2020) Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *International Journal of Food Science* **2020**, 9081686. <https://doi.org/10.1155/2020/9081686>

Šeremet D, Vojvodić Cebin A, Mandura A, Žepić I, Marković K, Komes D (2020) An insight into the chemical composition of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) by means of macro-component analysis and fractionation of phenolic compounds. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **15**, 133-138. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.15.3-4.3>

Villanueva-Carvajal A, Dominguez-Lopez A, Bernal-Martinez LR, Diaz-Bandera D (2013) *Hibiscus sabdariffa* L. confectionery gels, in vitro digestion, antioxidant activity and phenolic compounds quantification: a nutraceutical application. *International Journal of Food Science and Technology* **48**, 2659-2667. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12262>

Yadav N, Kumari A, Chauhan AK, Verma T (2021) Development of Functional Candy with Banana, Ginger and Skim Milk Powder as a Source of Phenolics and Antioxidants. *Current Research in Nutrition and Food Science* **9**, 855-865. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.9.3.13>

## Izjava o izvornosti

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

Shefkije Doroci

Vlastoručni potpis