

# Inkapsulacija polifenolnih spojeva trave ive (*Teucrium montanum* L.) elektroispredanjem

---

Miletić, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:129640>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2023.

Laura Miletić

**INKAPSULACIJA  
POLIFENOLNIH SPOJEVA  
TRAVE IVE (*Teucrium montanum L.*)  
ELEKTROISPREDANJEM**

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

*Hvala mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes na stručnim smjernicama, strpljivosti, izdvojenom vremenu i ljubaznosti prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala asistentici Ani Mandura Jarić, mag. ing., na prenesenom znanju, velikoj pomoći i susretljivosti tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala mojoj obitelji koja mi je bila najveća podrška tijekom cijelog fakultetskog obrazovanja i hvala mojim prijateljima koji su me oraspoložili i u najtežim danima ovog puta.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Upravljanje sigurnošću hrane

### INKAPSULACIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA TRAVE IVE (*Teucrium montanum* L.) ELEKTROISPREDANJEM

*Laura Miletić*, univ. bacc.ing. biotechn. 0058210983

**Sažetak:** Cilj ovog rada je inkapsulacija polifenolog ekstrakta trave ive (*Teucrium montanum* L.) elektroispredanjem uz primjenu dva nosača: pululana (10, 12 i 15 %) i polietilen oksida (5 i 8 %). Provedena je fizikalna karakterizacija otopina nosača pri čemu su određeni konduktivnost, viskoznost i površinska napetost.

Inkapsulacijska učinkovitost i kinetika otpuštanja (*in vitro* uvjeti) polifenolnih spojeva iz formiranih nanovlakana praćeni su spektrotometrijskim metodama određivanja udjela ukupnih polifenola (TPC) i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH), dok su dominantni polifenolni spojevi ehinakozid i verbaskozid određeni HPLC-DAD metodologijom. Morfološka karakterizacija dobivenih nanovlakana provedena je skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).

Za razliku od polietilen oksida, koji se nije pokazao pogodnim nosačem za inkapsulaciju polifenolnog ekstrakta trave ive, pululan je pokazao dobra svojstva elektroispredanja u svim udjelima. Ehinakozid je inkapsuliran u višem udjelu u odnosu na verbaskozid. Najbolji rezultate pokazala su nanovlakna formirana s 15 %-tnim pululanom, pri čemu je inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola iznosila 98,65 %, a ehinakozida 92,92 %.

**Ključne riječi:** antioksidansi, elektroispredanje, inkapsulacija, polifenoli, pululan, trava iva

**Rad sadrži:** 42 stranice, 10 slika, 5 tablica, 67 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ksenija Marković (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Draženka Komes (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (član)\*
4. prof. dr. sc. Božidar Šantek (zamjenski član)

**Datum obrane:** dan, mjesec, godina, (npr. 12. lipnja 2021.)

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Safety Management

### ENCAPSULATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS OF THE GRASS IVE (*Teucrium montanum* L.) BY ELECTROSPINNING

*Laura Miletić*, univ. bacc.ing. biotechn. 0058210983

**Abstract:** The aim of this paper is the encapsulation of the polyphenolic extract of mountain germander (*Teucrium montanum* L.) by electrospinning with the use of two carriers: pullulan (10, 12 and 15 %) and polyethylene oxide (5 and 8 %). The physical characterization of solution carriers was carried out where conductivity, viscosity and surface tension were determined. The encapsulation efficiency and release kinetics (in vitro conditions) of polyphenolic compounds from the formed nanofibers were monitored by spectrometric methods of determining the proportion of total polyphenols (TPC) and antioxidant capacity (DPPH), while the dominant polyphenolic compounds echinacoside and verbascoside were determined by HPLC-DAD methodology. Morphological characterization of the obtained nanofibers was carried out by scanning electron microscope (SEM). Unlike polyethylene oxide, which did not prove to be a suitable carrier for the encapsulation of polyphenolic extract of mountain germander, pullulan showed good electrospinning properties in all proportions. Echinacoside was encapsulated in a higher proportion than verbascoside. The best results were obtained from nanofibers formed with 15 % pullulan, where the total encapsulation efficiency of polyphenols was 98.65 %, and encapsulation efficiency of echinacoside was 92.92 %.

**Keywords:** antioxidants, electrospinning, encapsulation, polyphenols, pullulan, mountain germander

**Thesis contains:** 42 pages, 10 figures, 5 tables, 67 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** *Ana, Mandura Jarić*, Master's Degree in Biotechnology

#### Reviewers:

1. Ksenija, Marković, PhD, Full professor (president)
2. Draženka, Komes, PhD, Full professor (mentor)
3. Ksenija, Durgo, PhD, Full professor (member)
4. Božidar, Šantek, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** day, month, year (e.g. June 12<sup>th</sup>, 2021)

# SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1	TRAVA IVA (Teucrium montanum).....	2
2.1.1	Polifenolni spojevi trave ive.....	3
2.1.2	Feniletanoidni glikozidi.....	4
2.2	TEHNIKE INKAPSULACIJE.....	6
2.2.1	Elektroispredanje.....	8
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1	MATERIJALI.....	13
3.1.1	Uzorci.....	13
3.1.2	Kemikalije.....	13
3.1.3	Aparatura i pribor.....	14
3.2	METODE.....	15
3.2.1	Priprema liofiliziranog ekstrakta trave ive.....	15
3.2.2	Određivanje bioaktivnog sastava ekstrakta.....	16
3.2.3	Inkapsulacija elektroispredanjem.....	18
3.2.4	<i>In vitro</i> digestija.....	23
3.2.5	Statistička analiza.....	23
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1	Određivanje bioaktivnog ekstrakta.....	24
4.2	Fizikalna karakterizacija (bio)polimernih otopina za elektroispredanje.....	25
4.3	Inkapsulacijska učinkovitost.....	28
4.4	Morfološka karakterizacija nanovlakana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM).....	30
4.5	<i>In vitro</i> digestija.....	32
5	ZAKLJUČCI.....	34
6	LITERATURA.....	35



# 1 UVOD

Danas se na globalnom tržištu sve više osjeća nametanje ekološke svijesti, a zdrav način života postao je jedan od vodećih trendova. Sukladno tome, povećana je potražnja za nutritivno bogatim proizvodima i tzv. funkcionalnom hranom. Funkcionalna hrana, uz svoje osnovne prehrambene funkcije, pruža i određene zdravstvene benefite, kao što je primjerice smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti, jačanja imuniteta i slično.

Razvoj funkcionalne hrane vrlo često uključuje i inkorporiranje različitih biljnih ekstrakata i bioaktivnih sastojaka u pojedine prehrambene proizvode.

Polifenoli su najproučavanija skupina bioaktivnih spojeva koje, uz snažan antioksidacijski potencijal, karakteriziraju i brojni drugi pozitivni zdravstveni učinci: antimutageni, protuupalni, antimikrobni i sl. (Coman i sur., 2018). Zbog svojih nedostataka kao što su osjetljivost na razgradnju, neugodan senzorski profil, relativno niska bioraspoloživost i biodostupnost ne ugrađuju se direktno u hranu, već se za to koriste razne tehnike inkapsuliranja.

Tehnika elektroispredanja podrazumijeva inovativnu tehniku „zatvaranja“ aktivnih tvari unutar ugljikohidratnih i/ili proteinskih (bio)polimera pod visokim naponom koja rezultira formiranjem nanovlakna poželjnih strukturnih svojstava. Ova tehnika izazvala je veliki interes za širu primjenu u regenerativnoj medicini i bioinženjeringu tkiva, proizvodnji lijekova s kontroliranim prijenosom i otpuštanjem funkcionalnih komponenti te u proizvodnji zaštitnih tekstilnih materijala, industriji senzora, katalizatora itd. (Park, 2011).

Kao nosači aktivnih tvari koriste se razni proteini i polisaharidi, a jedan od posebno atraktivnih polimera za ovu tehniku inkapsulacije pokazao se pululan kojeg karakterizira GRAS status, velika stabilnost i topivosti u širokom pH rasponu, a slične prednosti u pogledu biorazgradivosti, netoksičnosti i topivosti u vodi karakteriziraju i polietilen oksid (Singh i sur., 2019).

Cilj ovog rada je inkapsulacija polifenolnog ekstrakta trave ive tehnikom elektroispredanja. U tu svrhu provest će se karakterizacija polifenolnog sastava biljnog ekstrakta i fizikalna karakterizacija otopina za elektroispredanje. Inkapsulacijska učinkovitost i kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva iz formiranih nanovlakana (*in vitro* uvjeti) pratit će se su spektrometrijskom (udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet) i HPLC-DAD (udjel ehinakozida i verbaskozida) metodologijom.

## 2 TEORIJSKI DIO

### 2.1 TRAVA IVA (*Teucrium montanum*)

Trava iva (*Teucrium montanum* L.) pripada rodu *Teucrium*, porodici Lamiaceae, red Lamiales, koji sadrži više od 300 biljnih vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu, od čega 96 % vrsta raste na Mediteranu. Rod *Teucrium* karakteriziraju aromatične i trajne zeljaste biljke ili polugrmovi koji sadrže cjelovite ili peraste listove na kratkoj peteljci. Pronađene su na različitim tlima, od jako lužnatih do kiselih i neutralnih tla, a preferiraju i vapnenačka i dolomitska tla (Lakušić i sur., 2009).

*Teucrium montanum* višegodišnja je zeljasta biljka visine od 5 do 30 cm s vrlo razvijenim vretenastim korijenom, a poznata je po nazivima gorski cmilj i dubačac mali. Sastoji se od blijedožutih cvjetova te listova eliptičnog oblika koji se prema vrhu postupno sužavaju (slika 1). Biljke su nađene na nadmorskim visinama od 30 pa sve do 2000 m. Cvjetanje se odvija u razdoblju od lipnja do kolovoza, a bere se samo nadzemni dio biljke koji se nakon toga suši (Stanković, 2020).

*T. montanum* opisuje se kao aromatična biljka gorkog okusa uz koju se veže antioksidacijsko, antifungalno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje. Koristi se u tradicionalnoj medicini kao začim, diuretik, sastojak velikog broja ljekovitih pripravaka za jačanje imuniteta, liječenje želučanih i probavnih tegoba, bolesti žučnog mjehura i žučnih puteva, apscesa i konjunktivitisa te bolesti dišnog sustava (Dajić-Stevanović i sur., 2013; Stanković i sur., 2011; Stanković i sur., 2012; Petrović, 2014). U Hrvatskoj se proteže Panonskom nizinom sve do juga obale Crne Gore te Jadranskom obalom do Dinarida (Lakušić i sur., 2009).

Prema osnovnom kemijskom sastavu trava iva sadrži 8,46 % proteina, 9,02 % mineralnih tvari, 1,68 % masti, 4,15 % topljivih vlakana, 52,96 % netopljivih vlakana i 23,73 % ostalih sastojaka. Udio suhe tvari u biljci iznosi 89,34 % , a ostalih 10,66 % čini voda.

Najzastupljenije mineralne tvari su kalcij i kalij, a zatim slijede željezo, magnezij, sumpor i fosfor. Trava iva sadrži klorofile, karotenoide i antocinijane, koji su ujedno i najzastupljeniji (Banik i sur., 2018). U bogatom bioaktivnim sastavu ove biljke ističu se fenolne kiseline, flavonoidi i terpenoidi (Stanković i sur., 2011).



**Slika 1.** Trava iva (*Teucrium montanum* L.) (Anonymous 1, 2023)

### 2.1.1 Polifenolni spojevi trave ive

Polifenolni spojevi su heterogena skupina spojeva različite kemijske strukture od jednostavnijih (fenolne kiseline) do složenijih (tanini), a identificirano je čak 8000 različitih struktura (Tsao, 2010). Smatraju se najraširenijom skupinom biljnih sekundarnih metabolita građenih od osnovne jedinice benzenskog prstena s hidroksilnim (-OH) skupinama kao supstituentima (Quideau i sur., 2011). Polifenolni spojevi dijele se na fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), flavonoide (antocijanine, flavanole, flavonole i flavone), tanine (kondenzirane i hidrolizirane) te na ostale polifenolne spojeve (lignane, kumarine i sl.) (Naczki i Shahidi, 2006).

Također, pokazuju antioksidacijsko djelovanje što znači da u prisustvu drugog spoja usporavaju ili u potpunosti sprječavaju oksidaciju. Na taj način sudjeluju u mnogim procesima kao što su neutralizacija slobodnih radikala, inhibicija u enzima koji sudjeluju u sintezi slobodnih radikala, keliranje metalnih iona koji mogu stvarati slobodne radikale te regeneracija membranskih antioksidansa (Niki, 2010).

Zahvaljujući brojnim znanstvenim istraživanjima postepeno se upotpunjuju spoznaje o bioaktivnom sastavu trave ive kojima se potvrđuju navodi o biološkoj aktivnosti i antioksidacijskom djelovanju biljke. Utvrđeno je da udio polifenola ovisi o polarosti korištenih otapala tijekom procesa ekstrakcije te o dijelu biljke koji se ekstrahirao (Stanković, 2011). Ako se provodi ekstrakcija polifenola iz listova, najbolje će odgovarati polarno

otapalo, dok se u slučaju ekstrakcije iz stabljike preporučuje nepolarano. Identificirane bioaktivne komponente u najvećem udjelu uključuju fenolne kiseline i njihove derivate, flavonoide i terpene koji odgovorni za najvažnije biološke karakteristike biljke *T. montanum* (Stanković, 2020). Tako su Tumbas i sur. (2004) u uzorcima trave ive iz područja Zlatibora (Srbija) identificirali derivate hidroksibenzojeve kiseline (galna, vanilinska, siringinska, protokatehinska i gentisična kiselina) te hidroksicimetne kiseline (kafeinska kiselina, ferulinska, klorogenska, *p*-kumarinska, i 3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina). Nastić i sur. (2018) proučavali su utjecaj temperature i tlaka tijekom ekstrakcije subkritičnom vodom na prinos ukupnih polifenola i antioksidacijska svojstva ekstrakata. Najveće vrijednosti dobivene su kombinacijom temperature od 160 °C i tlaka od 10 bara. HPLC-PDA analiza pokazala je da su naringin i galna kiselina dominantni polifenolni spojevi, a odredili su i prisutnost protokatehinske, klorogenske, vanilinske, kafeinske i ferulinske kiseline te flavonoida (+)-katehina, epikatehina i rutina. Zlatić i sur. (2017) zaključili su da je udio ukupnih polifenolnih spojeva i flavonoida veći u metanolnim ekstraktima *T. montanum* uzorkovanim sa serpentinskih lokaliteta nego u uzorcima s vapnenačkih nalazišta. Nadalje, u radu Đilasa i sur. (2006) etil acetatni i *n*-butanolni ekstrakti nadzemnih dijelova *T. montanum* pokazali su značajnu aktivnost hvatanja slobodnih radikala uklanjanjem 58,79 odnosno 100 % slobodnih radikala DPPH, određenih elektronskom spinskom rezonancijom.

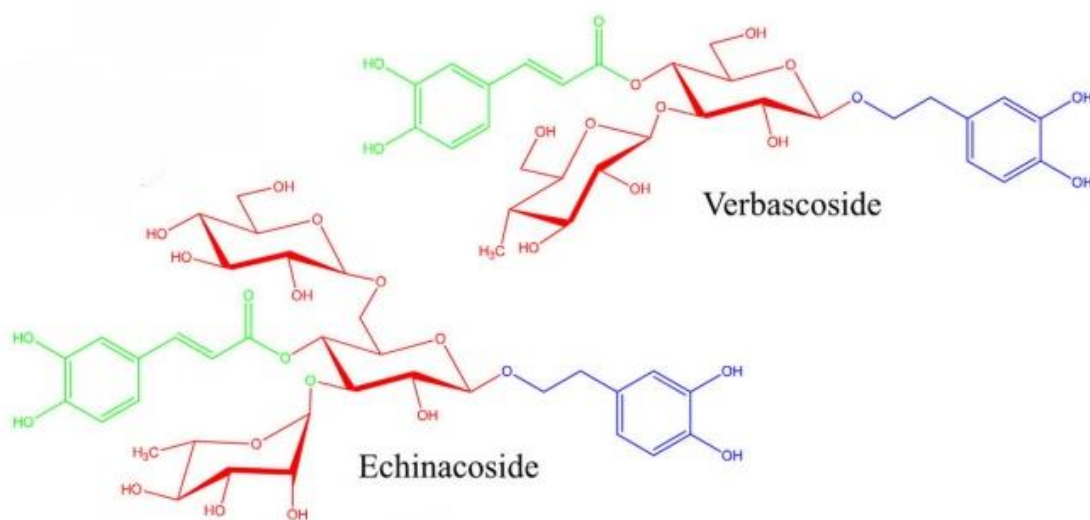
### 2.1.2 Feniletanoidni glikozidi

Feniletanoidni glikozidi (PhG) fenolni su spojevi topljivi u vodi koji se nalaze u mnogim ljekovitim biljkama. Prve objavljene reference o feniletanoidnim glikozidima odnosile su se na izolaciju ehinakozida iz *Echinaceu unguistifolia* (Asteraceae) 1950. i verbaskozida iz *Verbascum sinuatum* (Scrophulariaceae) 1963. godine. Tijekom proteklih 60 godina, mnogi spojevi s ovim strukturnim karakteristikama izolirani su iz prirodnih izvora i većina ovih spojeva posjeduje značajne bioaktivne karakteristike, uključujući antibakterijske, antitumorske, antivirusne, protuupalne, neuroprotektivne, antioksidacijske, hepatoprotektivne i imunomodulatorne učinke (Tian i sur., 2020). Do lipnja 2020. godine izolirano je i identificirano više od 572 vrste PhG-a (Wu i sur., 2020). PhG su naširoko prisutni u raznim vrstama, posebno u dvosupnicama iz obitelji *Scrophulariaceae*, *Lenzaceae*, *Chicoraceae*, *Hibiscus*, *Magnoliaceae* i *Compositae*. U posljednjih nekoliko godina različiti PhG izolirani su iz obitelji *Verbenaceae*, *Acanthaceae*, *Berberidaceae* i *Plantaginaceae*. Također, sadrže ih i neke tradicionalne ljekovite biljke kao što su *Cistanche* (pustinjska repa), *Scrophularia*

(strupnik), *Ligustrum lucidum* (japanska kalina), *Rehmannia* (kineski naprstak), *Forsythia suspensa* (obična forzicija) i *Chirita longgangensis* (primulina) te narodni lijekovi, poput *Lamiophlomis rotata* (kineski narodni lijek) (Tian i sur., 2020).

Osnovnu strukturu PhG-a čini aglikonski dio sastavljen od feniletanoidne jedinice-hidroksitirosola i fenilpropanoidne jedinice- kafeinske, ferulinske ili neke druge hidroksicimetne kiseline, a koji je vezan za šećernu skupinu, uglavnom  $\beta$ -D-glukopiranozu, putem glikozidne veze na C-1 mjesto. Ramnoza, ksiloza, arabinoza, aloza, galaktoza i apioza, između ostalih, također mogu biti vezane za ostatak glukoze. Raznolikost šećera, kao i prisutnost različitih hidroksicimetnih kiselina, čini veliku bioraznolikost ovih spojeva. Općenito, broj šećera kreće se od jedan do tri. Međutim, povremeno se pronadu i ostaci četiri i pet šećera. Prema broju šećera vezanih na aglikonske dijelove, PhG se mogu klasificirati u monosaharidne, disaharidne, trisaharidne, tetrasaharidne i pentasaharidne PhG (Wu i sur., 2020).

Feniletanoidni glikozidi do sada pronađeni u vrsti *T. montanum* su verbaskozid, ceruleskenozid, ehinakozid, kastanozid A, forsitozid B i samiozid (Stanković, 2020). Struktura ehinakozida i verbaskozida, koji su od navedenih feniletanoidnih glikozida najzastupljeniji u travi ivi, prikazana je na slici 2.



**Slika 2.** Struktura ehinakozida i verbaskozida (Wu i sur., 2020)

Osim značajne biološke uloge u interakcijama biljaka u ekosustavu, sekundarni metaboliti koji su izolirani iz biljnog organizma pokazuju biološku aktivnost i u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Mehanizam njihovog djelovanja u biološkom sustavu uglavnom uključuje stimulaciju ili inhibiciju enzimske aktivnosti i drugih metaboličkih procesa gdje dolazi do

izražaja njihova terapijski učinak.

## 2.2 TEHNIKE INKAPSULACIJE

Inkapsulacija je proces zarobljavanja aktivnih tvari unutar nosača i koristan je alat za poboljšanje „isporuke” bioaktivnih molekula i živih stanica iz hrane. Također, inkapsulacija podrazumijeva tehniku koja može stvoriti barijere između osjetljivih bioaktivnih materijala i okoliša te tako omogućiti razlikovanje okusa i arome, maskirati loš okus ili miris, stabilizirati sastojke hrane ili povećati njihovu bioraspoloživost. Jedan od najvažnijih razloga inkapsulacije aktivnih sastojaka je osigurati njihovu stabilnost u konačnim proizvodima i tijekom obrade. Osim toga, prednost inkapsulacije je i manje isparavanje te razgradnja hlapljivih aktivnih tvari poput arome. Nadalje, inkapsulacija se koristi za prikrivanje neugodnih osjećaja tijekom jela, poput gorčine i trpkosti polifenola. Cilj primjene inkapsulacije je i taj da se spriječi reakcija s drugim komponentama u prehranbenim proizvodima kao što su kisik ili voda. Inkapsulacija se može koristiti i za imobilizaciju stanica ili enzima u aplikacijama za preradu hrane, kao što su procesi fermentacije i procesi proizvodnje metabolita. Sve je veći zahtjev za pronalaskom odgovarajućih rješenja koja osiguravaju visoku produktivnost, a istovremeno zadovoljavaju odgovarajuću kvalitetu finalnih prehranbenih proizvoda (Nedović i sur., 2011). Materijali korišteni za dizajn zaštitne ovojnice inkapsulata moraju biti pogodni za prehranbene svrhe, biorazgradivi te sposobni stvoriti barijeru između unutarnje faze i njezine okoline. Od svih materijala za inkapsulaciju s primjenom u prehranbenim proizvodima najčešće se koriste polisaharidi, iako su prikladni i proteini i lipidi.

Postoji niz dostupnih tehnika za inkapsulaciju prehranbenih spojeva. Budući da su spojevi za inkapsulaciju vrlo često u tekućem obliku, mnoge tehnologije se temelje na sušenju. Za inkapsulaciju aktivnih tvari dostupne su različite tehnike kao što su sušenje raspršivanjem, ionsko geliranje, tehnike emulzije, tehnike koacervacije, liposomska inkapsulacija i slično (Nedovic i sur., 2011). Sušenje raspršivanjem najšire je primjenjivana tehnika inkapsulacije u prehranbenoj industriji jer je fleksibilna, kontinuirana, ali i ekonomična. Proizvodi čestice dobre kvalitete, veličine do 40  $\mu\text{m}$ . Ova značajka poželjna je sa stajališta osjetilnih i teksturalnih karakteristika finalnih proizvoda. Iako su uređaji za sušenje raspršivanjem rašireni u prehranbenoj industriji, postoji nekoliko nedostataka ove tehnike kao što su složenost opreme, neujednačeni uvjeti u komori za sušenje i to što nije uvijek lako

kontrolirati veličinu čestica. Otprilike 80-90 % inkapsulata osušeni su raspršivanjem, a ostatak se uglavnom priprema hlađenjem raspršivanjem, sušenjem smrzavanjem, ekstruzijom taline i ubrizgavanjem taline. Metode ekstruzije se sastoje od kapanja kapljica vodene otopine polimera i aktivne tvari u kupelj za geliranje. Alat za kapanje može biti pipeta, štrcaljka, vibrirajuća mlaznica, mlaznica za raspršivanje, mlazni rezač ili raspršivač. Elektrostatska ekstruzija posebno je učinkovita za proizvodnju vrlo malih čestica, do 50 µm. Druga često korištena tehnika je emulgiranje. Koristi se u slučaju aktivnih tvari iz hrane topljivih u vodi i postoje dvije kombinacije emulzija: emulzije voda/ulje ili emulzije ulje/voda i dvostruke emulzije voda/ulje/voda. Emulzija ulja u vodi može se sušiti različitim metodama kao što je sušenje raspršivanjem ili smrzavanjem kako bi se pripremile kapsule ili instant formulacije za brojne prehrambene proizvode (Nedovic i sur., 2011).

Cegledi i sur. (2022) tehnikom raspršivanja uspješno su inkapsulirali ekstrakt koprive (*Urtica dioica* L.) što se pokazalo kao obećavajući alat za očuvanje i stabilizaciju vrijednih antioksidansa s povećanom bioraspoloživošću, čime je omogućena njihova primjena u funkcionalnim prehrambenim proizvodima. Istu tehniku su primijenili i Ribeiro i sur. (2019) kako bi postigli uspješnu inkapsulaciju flavanoida antocijana i kvarcetina iz cvjetova i stabljike bazge (*Sambucus nigra* L.) u mikročestice. Tehnika ionskog geliranja korištena je u radu de Moura i sur. (2019) kako bi se utvrdila učinkovitost dvostruke emulzije praćene ionskim geliranjem u inkapsulaciji ekstrakta antocijanina *Hibiscus sabdariffa* L. s primjenom u prehrambenoj matrici jogurta. Tehnika ionskog geliranja pokazala se izrazito učinkovitom, a matrica jogurta s dodatkom dobivenih mikročestica pokazala je visoku prihvatljivost izgleda. Također, Cutrim i sur. (2019) ionskim geliranjem inkapsulirali su ekstrakt praha zelenog čaja, dok su Bannikova i sur. (2020) tehnikom koacervacije pripremili mikrokapsule polifenola i ksilooligosaharida iz zobnih mekinja s proteinima sirutke i maltodekstrina, kao sustavom nosača.

Ngwuluka i sur. (2020) pratili su napredak nanotehnologije u posljednja dva desetljeća i uspoređivali nano- i mikroinkapsulaciju. Navode kako ishod bilo koje tehnike inkapsulacije ovisi o mahanizmu tehnike i nosačima za inkapsulaciju aktivnih sastojaka. U tablici 1 navedena je klasifikacija tehnika inkapsulacije ovisno o njihovom principu/mehanizmu.

**Tablica 1.** Klasifikacija inkapsulacijskih tehnika (Ngwuluka i sur., 2020)

Fizikalno/mehaničko/termalne				Fizikalno-kemijske	Kemijske
premazivanje	atomizacija	ekstruzija	termalne	koacervacija	polimerizacija
pan	spinning disk	stacionarna mlaznica	sušenje raspršivanjem	taloženje sloj po sloj	suspenzija
fluidni sloj		centrifugalna	sušenje hlađenjem	isparavanje otapala	emulzija
		koekstruzija	sušenje zgrušavanjem	molekularna inkluzija	interfacijalna
		elektrohidrodinamička (elektrosprejanje i elektroispredanje)	inverzija faza	sol-gel	
		mikroekstruzija			
		ekstruzija s jednim ili dva vijka			

### 2.2.1 Elektroispredanje

Elektroispredanje kao tehnika inkapsulacije bioaktivnih spojeva, uključujući lijekove, koristi električne sile za proizvodnju polimernih vlakana u rasponu promjera od 2 nm do nekoliko mikrometara. Ova tehnika doživjela ogroman interes u istraživačkom i komercijalnom smislu tijekom prošlog desetljeća. Jednostavna je, laka i svestrana tehnika kod koje se primjenom polimernih nosača formiraju vlakana s visokim omjerom površine i volumena te poroznošću. U usporedbi s tradicionalnim tehnikama inkapsulacije, ključna prednost elektroispredanja je odsutnost topline što je važno za očuvanje strukture i postizanje visoke učinkovitosti inkapsulacije bioaktivnih tvari. Bioaktivni spojevi, inkapsulirani unutar elektroispredanih vlakana, posjeduju povećanu stabilnost i funkcionalnost. Tako su zahvaljujući promjerima od submikronskih do nano veličina, kao i velikoj površini, elektroispredana vlakna bolje reagirala na promjene u okolnoj atmosferi (npr. relativna vlažnost i promjene temperature) u usporedbi s filmskim i pločastim nosačima, a mogu i kontrolirano otpuštati inkapsulirane spojeve (Wen i sur., 2017).



Nadalje, ova tehnika nudi jedinstvene mogućnosti za proizvodnju novih prirodnih nanovlakana i tkanina sa strukturom pora koja se može kontrolirati. S manjim porama i većom površinom od običnih vlakana, elektroispredena vlakna uspješno se primjenjuju u raznim područjima kao što su nanokataliza, tkivno inženjerstvo, zaštitna odjeća, filtracija, biomedicina, farmacija, optička elektronika, zdravstvo, biotehnologija, obrana i sigurnost te inženjerstvo zaštite okoliša (Bhardwaj i Kundu, 2010). Ispredena nanovlakna također nude nekoliko prednosti, kao što su izuzetno visok omjer površine i volumena, podesiva poroznost, savitljivost za prilagodbu velikom broju veličina i oblika i mogućnost kontrole sastava nanovlakana kako bi se postigli željeni rezultati na temelju njihovih svojstava i funkcionalnosti (Liang i sur., 2007). Međutim, potencijalna primjena elektroispredanja u području znanosti o hrani relativno je nova i manje istražena (Wen i sur., 2017).

Elektroispredanje se izvodi na sobnoj temperaturi uz atmosferske uvjete. Elektroispredena vlakna mogu se proizvesti samo unutar određenog raspona koncentracije i viskoznosti uzoraka. Za uspješno elektroispredanje važno je optimizirati proces elektroispredanja na način da se optimiziraju svi parametri: koncentracija polimera, konduktivnost, viskoznost, primijenjeni napon, udaljenost vrh-kolektor, brzina protoka i čimbenici okoliša (vlažnost i temperatura) (Jacobs i sur., 2010).

Promjena koncentracije otopine mijenja viskoznost otopine i time značajno utječe na rezultirajuću morfologiju vlakana. Svaki polimer ima optimalni raspon koncentracije, a promjer vlakna povećava se povećanjem koncentracije polimera. Ako se otopina razrijedi, odvija se proces elektrosprejanja umjesto elektroispredanja budući da se mlaz tekućine razbija u kapljice površinskom napetošću otopine. To dovodi do stvaranja zrnatih vlakana ili mješavine zrnaca i vlakana (Sharma i sur., 2014). Nadalje, molekularna masa polimera odražava se na isprepletenost polimernih lanaca što je važno kako bi mlaz tekućine prevladao površinsku napetost i na kraju formirao glatka vlakna. Molekularna masa polimera ima značajan učinak na električna, i reološka svojstva. Slično koncentraciji, visoka molekularna masa pogoduje stvaranju mikrovrci. Otopina polimera visoke molekularne mase stvara vlakna većeg promjera, dok polimeri niske molekularne mase imaju tendenciju formiranja kuglica (Klossner i sur., 2008). Konduktivnost otopine može kontrolirati distribuciju promjera vlakana. Otopina vrlo niske konduktivnosti ne može se elektroispredati budući da površina kapljice ne nosi nikakav naboj koji bi tvorio Taylorov stožac. Kao rezultat toga ne može doći do elektroispredanja. Povećanjem konduktivnosti otopine polimera smanjuje se promjer vlakana. Međutim, otopine polimera s konduktivnošću iznad kritične vrijednosti izuzetno su nestabilne pod jakim električnim poljima, uzrokujući divergenciju širokog

promjera. Konduktivnost otopine određena je vrstom polimera, otapalom i koncentracijom soli (Ding i sur., 2014).

Na promjer i morfologiju vlakana snažno utječe i viskoznost otopine polimera tijekom procesa elektroispredanja. Neće biti moguće kontinuirano stvaranje vlakana s otopinom polimera vrlo niske viskoznosti, dok je s vrlo visokom viskoznošću teško postići mlazno ubrizgavanje iz otopine polimera, tako da je za učinkovit proces elektroispredanja potrebna optimalna viskoznost otopine polimera (Klossner i sur., 2008).

Sljedeći parametar koji utječe na promjer i morfologiju vlakna je brzina protoka otopine. S većim brzinama protoka, povećava se promjer vlakana. Ako je brzina protoka iznimno visoka, otapalo možda neće potpuno ispariti tijekom prijenosa iz predilnice u kolektor. To može dovesti do formiranja vlakana zrnate morfologije (Dehghani i Annabi, 2011).

Napon je jedan od najvažnijih čimbenika među parametrima tehnike elektroispredanja. Viši napon rezultira većom elektrostatskom odbojnom silom na mlaz tekućine, što pogoduje sužavanju promjera vlakana (Ding i sur., 2014). Promjer vlakana se povećava kako se smanjuje udaljenost između igle i kolektora. Ako je prekratka udaljenost, mogu se pojaviti vlakna zrnate morfologije zbog neadekvatnog sušenja (Bhardwaj i Kundu, 2010).

Osim tehničkih parametara i parametara otopine, okolišni čimbenici poput relativne vlažnosti i temperature također utječu na morfologiju i promjer vlakana kroz proces skrućivanja. Međutim, ovaj je učinak općenito prilično ograničen u usporedbi s drugim parametrima. Promjer vlakana obično se smanjuje s povećanjem temperature što uzrokuje manju viskoznost otopina polimera. Male pore na površini vlakana uz zrnasta vlakna mogu se stvoriti zbog veće vlažnosti (Agrahari i sur., 2017).

Primijenjeni napon, koji je potreban za prevladavanje sila viskoznosti i površinske napetosti otopine polimera, značajno ovisi o svojstvima polimera i otapala koji se koriste (Elsabee i sur., 2012).

S ekološkog stajališta, elektroispredanje polimera topivih u vodi nudi ekološku alternativu drugim metodama koje koriste organska otapala zbog njihove moguće toksičnosti. Da bi se otapalo koristilo za elektroispredanje, ono mora otopiti polimerni lanac i biti dovoljno hlapljivo da ispari unutar potrebne udaljenosti koja odvaja mlaznicu od kolektora. To zahtijeva upotrebu organskih otapala koja mogu biti i toksična, što istovremeno isključuje korištenje ove tehnike u okruženjima u kojima je zaštita na radu ključna, kao što su farmaceutska i prehrambena industrija (Nagy i sur., 2015). Voda je vrlo poželjno otapalo za razne primjene jer, osim što nije toksična, nije ni zapaljiva, biokompatibilna je i jeftina. Međutim, elektroispredanje polimera topljivih u vodi izazovan je zadatak jer voda ima visoku

površinsku napetost i dielektričnu konstantu, a s druge strane i neki polimeri topljivi u vodi imaju vrlo velike molekularne mase, kristalne strukture i krute molekularne konformacije (Krishnan i sur., 2013). Na temelju podrijetla, polimeri topljivi u vodi mogu se klasificirati u dvije glavne kategorije: prirodni i sintetski. Budući da se većina sintetskih polimera može elektroispredati iz svojih vodenih otopina bez dodatka drugog polimera, surfaktanta ili soli, u praksi im se vrlo često daje prednost u odnosu na prirodne polimere.

Najčešće korišteni sintetski polimeri topljivi u vodi su: polietilen oksid (PEO), polivinil alkohol (PVA) i polivinil pirolidon (PVP), a najčešći prirodni polimeri su alginat, derivati celuloze, derivati kitozana, kolagen, dekstran i želatina (Badran i sur., 2019). Do sada su već brojni polimeri ispitani kao nosači aktivnih sastojaka tijekom elektroispredanja: želatina (Wang i sur., 2019), amarant (Blanco-Padillai i sur., 2015), proteini sirutke (Drosou i sur., 2018), pululan (Aguliar-Vásquez i sur., 2018), kitozan (Qin i sur., 2019), hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin (Poudel i sur., 2020).

Pululan je posebno atraktivan biopolimer zbog svoje linearne strukture i neionskih jedinica maltotrioze povezanih preko  $\alpha$ -1-6 gliozidnih veza, stabilnosti i topivosti u širokom pH rasponu, GRAS statusa i sposobnosti formiranja stabilnih i fleksibilnih nanovlakna iz vodenih otopina (Singh i sur., 2019). Budući da je to egzopolisaharid dobiven iz škrobnih biljaka i agro-otpada, prikladan je za održivu i ekonomičnu proizvodnju. Slične prednosti glede biorazgradivosti, netoksičnosti i topivosti u vodi pripisuju se PEO-u, polimeru etilenskih jedinica s molekularnom masom većom od 20000 g/mol. PEO je biokompatibilni polimer koji je klinički odobrila Uprava za hranu i lijekove (FDA) i druge regulatorne agencije. Iz tog razloga opsežno se istražuje i koristi u biomedicinske svrhe. Vodene PEO otopine mogu se uspješno elektroispredati sa ili bez miješanja s drugim polimerima (Badran i sur., 2019).

Leidy i Maria Ximena (2019) naveli su da je do listopada 2018. godine objavljeno 130 radova koji uključuju primjenu elektroispredanja na području hrane, što je 2,2 % u odnosu na sva istraživanja u području elektroispredanja, a brojka se posebice povećala nakon 2012. godine. Emulzije, liposomi, prahovi i drugi proizvodi korišteni su za inkapsulaciju elektroispredanjem različitih bioaktivnih spojeva, kao što su folna, galna i ferulinska kiselina, kvercetin, ulja i vitamini. Nadalje, ovom tehnikom mogu se zaštititi i neki labilni, osjetljiviji spojevi, kao što je primjerice vitamin A koji je nestabilan u nekim tipičnim uvjetima obrade hrane (npr. svjetlo, pH ili promjene temperature, prisustvo oksidansa). Karotenoidi ekstrahirani iz kore rajčice također su inkapsulirani u elektrosipredena vlakna na bazi želatine. Zadržavanje likopena, antioksidacijska aktivnost i topljivost u vodi poboljšani su kada su karotenoidi zaštićeni vlaknom, u usporedbi s neinkapsuliranim ekstraktom (Leidy i

Maria Ximena, 2019). Ulje sjemenki šipka izvor je nezasićenih masnih kiselina, kao i fitokemikalija, tokoferola, sterola i karotenoida, te je stoga koaksijalno inkapsulirano u zein-prolaminska vlakna, postizujući visoku učinkovitost inkapsulacije i kapacitet punjenja uljem (Yao i sur., 2016). Estevez-Areco i sur. (2018) elektroispredanjem su formirali nanovlakna s polifenolnim spojevima ružmarina pomoću polimera polivinil alkohola (PVA) kako bi omogućili njihovo zadržavanje i poboljšali im toplinsku stabilnost. Dokazali su da je takva kombinacija PVA i spojeva ružmarina u nanovlaknima pogodna kao aktivna ambalaža za prehrambene proizvode, posebice za hidrofilne i kisele proizvode.

Nadalje, Torkamani i sur. (2017) inkapsulirali su polifenolne spojeve gorke tikve (*Momordica charantia*) uz pomoć želatine kao nosača. Procesom inkapsulacije sačuvano je prosječno 88 % antioksidacijskog potencijala, a stabilnost inkapsuliranog ekstrakta pri čuvanju u rashlađenim i sobnim uvjetima značajno je povećana u usporedbi s njihovim neinkapsuliranim ekvivalentima. U radu iz 2021., Zhang i sur. konstruirali su polifunkcionalna nanovlakna od škroba i polifenola čaja procesom elektroispredanja. Rezultati su pokazali da se antioksidacijska aktivnost značajno povećala u odnosu na vlakna koja nisu sadržavala polifenole čaja. Na taj način nudi se veliki korak naprijed u promicanju funkcionalnih materijala na bazi škroba za održivu primjenu u pakiranju hrane.

Alchera i sur. (2022) dizajnirali su nanovlakna dobivena inkapsulacijom polifenola iz nusproizvoda crnog ribiza i aktivnog maltodekstrina tehnikom elektroispredanja. Dobiveni rezultati pokazali su antimikrobno djelovanje nanovlakana na ispitane uzorke voća te impliciraju mogućnost njegove uporabe u svrhu produljenja roka trajanja voća.

Elektroispredena vlakna koriste se i kao nosači antimikrobnih ili antibakterijskih spojeva protiv nekih mikroorganizama i osiguravaju kvalitetu i očuvanje hrane. Polihidroksibutirat je ekstrahiran iz *Spirulina sp.* LEB 18 (mikroalga) i kao biopolimer se koristio za inkapsulaciju fenolnih spojeva, kao antimikrobnih agenasa kako bi se formirala elektroispredena vlakna koja imaju antibakterijsko djelovanje protiv *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ali i odgovarajuća toplinska i mehanička svojstva te se mogu koristiti kao materijal za pakiranje (Kuntzler i sur., 2018). Nadalje, polifenoli čaja inkapsulirani pomoću pululana i natrijeve karboksimetil-celuloze (Na-CMC) dodani su u konzervirane jagode kako bi održavali njihovu čvrstoću i kvalitetu tijekom skladištenja (Shao i sur., 2018). Eterična ulja timijana i đumbira također su korištena kao antimikrobna sredstva unutar vlakana protiv *Campylobacter jejuni* (Lin i sur., 2018) i pet vrsta bakterija (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium* i *Pseudomonas aeruginosa*) (Tavares da Silva i sur., 2018).

## 3 EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 MATERIJALI

#### 3.1.1 Uzorci

U eksperimentu su korišteni nadzemni dijelovi biljke trave ive (*Teucrium montanum* L.), sakupljene u jadranskoj regiji Republike Hrvatske na mikrolokaciji Varivode, Općine Kistanje (Šibensko-kninska županija). Biljni materijal je sakupljen od strane dugogodišnjeg sakupljača ove biljne vrste, očišćen od stranih primjesa te osušen na suhom i prozračnom mjestu. U cilju osiguranja reprezentativnog uzorka, korišten je prethodno usitnjeni i prosijani biljni materijal veličine čestica < 450 μm.

#### 3.1.2 Kemikalije

##### (Bio)polimeri kao inkapsulacijski nosači:

- Pululan, Biosynth Carbosynth (UK)
- Polietilen oksid (Mr: 300 000 g/mol, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD))

##### Spektrofotometrijske metode:

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Bezvodni natrijev karbonat, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (>99 %), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Metanol (100 %, HPLC čistoće), GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; min 85 % CHN), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (>99 %), Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

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

- Mravlja kiselina (100 %, HPLC čistoće), Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)
- Acetonitril (100 %, HPLC čistoće), Fischer Scientific (Waltham, SAD)

### In vitro digestija:

- Puferska otopina za simulaciju želučane faze (pH=3) sastavljene od kalijevog klorida, natrijevog hidrogenkarbonata, natrijevog klorida, kalijevog dihidrogenfosfata, magnezijevog klorida heksahidrata i amonijevog karbonata, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Puferska otopina za simulaciju intestinalne faze (pH=7) sastavljene od kalijevog klorida, natrijevog hidrogenkarbonata, natrijevog klorida, kalijevog dihidrogenfosfata, magnezijevog klorida heksahidrata i amonijevog karbonata, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 1 M HCl (p.a. čistoće) za regulaciju pH
- 1 M NaOH za regulaciju pH
- Pepsin podrijetlom iz želučane sluznice svinja, enzimske aktivnosti 474 U/mg, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)
- Pankreatin podrijetlom iz svinjske gušterače, 4\*USP, Sigma Aldrich (St. Louis, SAD)

### 3.1.3 Aparatura i pribor

- Laboratorijski pribor: teflonski magneti, Pasteur pipete, optičke kivete za spektrofotometar, plastične šprice (2 mL), mikrofilteri od regenerirane celuloze (veličine pora 0,20 µm), HPLC vialice za uzorke s navojnim čepovima- Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (50 mL), Eppendorf epruvete (2 mL), Pasteur pipete
- Laboratorijsko stakleno posuđe: odmjerne tikvice, reagens boce, menzure, laboratorijske čaše, staklene epruvete, pipete
- Mikropipete Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Električni mlinac za usitnjavanje, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)
- Uređaj za homogenizaciju reakcijske smjese, Dlab Scientific (Schiltigheim, Francuska)
- Digitalni refraktometar Kern ORF-B (Kern & Sohn, Njemačka)
- Analitička vaga New Classic ML204/01, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Centrifuga SL 8R, Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)

- Magnetska mješalica SMHS-6, Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- Rotacijski vakuum uparivač IKA RV8 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj S60H Elmasonic, Elma Schmidbauer (Singen, Njemačka)
- Spektrofotometar Genesys<sup>TM</sup> 10S UV-VIS, Thermo Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od degazera, kvarterne pumpe, automatskog injektora, termostata kolone i DAD (eng. Diode-Array Detector) detektora
- HPLC kolona Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 μm, 100 Å), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- Konduktometar Cond-330i, WTW (Weilheim, Njemačka)
- Viskozimetar RM 100 plus, Lamy Rheology (Champagne au Mont d'Or, Francuska)
- Tenziometar DCAT, DataPhysics (Filderstadt, Njemačka)
- Uređaj za elektroispredanje Spinbox Systems, Bioinicia (Valencia, Španjolska)
- Digitalni termohigrometar Boneco 200X (St. Gallen, Švicarska)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprema liofiliziranog ekstrakta trave ive

Vodeni ekstrakt trave ive za liofilizaciju pripremljen je konvencionalnom metodom ekstrakcije (100 °C, 1g uzorka:100 mL otapala, 30 min) u borosilikatnoj laboratorijskoj boci s navojnim čepom. Nakon završetka ekstrakcije, dobiveni ekstrakt je ohlađen, profiltriran kroz papirnate filtere za biljne infuzije i uparavan na rotacijskom vakuum uparivaču (RV8, IKA) pri temperaturi vodene kupelji od 40 °C do suhog. Talog iz tikvice je resuspendiran u minimalnoj količini vode u svrhu maksimalne koncentracije suhe tvari ekstrakta. Tako pripremljeni ekstrakt liofiliziran je tijekom 24 h (liofilizator Christ, Alpha LSCplus, Njemačka), pripremljeni su koncentrirani ekstrakti. Otapanjem liofilizata (0,28 g liofilizata u 10 mL vode) dobiven je ekstrakt koji je 10 puta koncentriraniji u odnosu na izvorni ekstrakt, obzirom na ekstraktibilnu suhu tvar ekstrakta (28,2 %) i u njemu je otopljen polimerni nosač.

## 3.2.2 Određivanje bioaktivnog sastava ekstrakta

### 3.2.2.1 Određivanje udjela ukupnih polifenola (TPC metoda)

#### Princip metode

TPC metoda (engl. Total Phenolic Content) naziv je za analitičku metodu kojom se određuje ukupan broj polifenola u uzorku, a temelji se na kolorimetrijskoj reakciji u kojoj sudjeluju Folin-Ciocalteu reagens te reducirajući reagens (fenoli). Tijekom reakcije dolazi do prijenosa elektrona s fenoksid iona fenolnog spoja na Folin-Ciocalteu reagens (smjesu fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) pri čemu se fenoksid ion oksidira, dok se Folin-Ciocalteu reagens reducira i uzrokuje plavo obojenje koje predstavlja prisutnost volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999).

#### Postupak rada

U epruvete se otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100  $\mu$ L uzorka, 500  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa (pripremljen razrjeđivanjem s vodom u omjeru 1:2) te 1, 5mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata. Za slijepu se probu umjesto 100  $\mu$ L uzorka otpipetira 100  $\mu$ L destilirane vode. Tako pripremljeni uzorci se vorteksiraju i ostave stajati 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija plavog obojenja na 765 nm. Kod izmjerenih vrijednosti se apsorbancija slijepe probe oduzima od apsorbancije ekstrakta, a dobiveni intenzitet obojenja direktno je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Kako bi se odredio udio ukupnih polifenola, potrebno je izraditi baždarni dijagram (u ovom slučaju kao standard je odabrana galna kiselina) koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda. Pomoću jednadžbe baždarne krivulje udio ukupnih polifenola izračunava se na sljedeći način:

$$y=0,0010x - 0,0001 \quad [1]$$

pri čemu je:

x – udio ukupnih polifenola (mg/L)

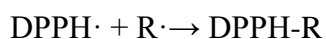
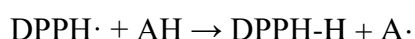
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm.



### 3.2.2.2 *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom*

#### Princip metode

DPPH metoda temelji se na redukciji ljubičasto obojenog stabilnog DPPH· radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) otopljenog u metanolu u prisutnosti antioksidansa. Do kolorimetrijske reakcije dolazi u trenutku kada se, u prisutnosti elektron donora –AH (antioksidansa), sparuje elektronski par DPPH radikala. Smanjenje obojenja te, posljedično, i smanjenje apsorbancije uslijed reakcije mjeri se pri maksimumu apsorpcije reakcijske smjese pri 515 nm.



#### Postupak rada

Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH radikala u metanolu te se takva otopina zbog fotosenzitivnosti drži omotana u aluminijsku foliju. Apsorbancija izmjerena na spektrofotometru mora biti približno 1. U epruvete se otpipetira 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 3,9 mL pripremljene otopine DPPH nakon čega se epruvete vorteksiraju i ostave stajati 30 minuta u mraku. Apsorbancija se mjeri na 515 nm. Za pripremu slijepe probe se umjesto ekstrakta dodaje 100  $\mu\text{L}$  otapala, u ovom slučaju metanola te 3,9 mL otopine DPPH kao za ostale uzorke. (Brand-Williams i sur., 1995).

Izmjerena apsorbancija ekstrakta oduzima se od izmjerene apsorbancije slijepe probe i tako dobivena vrijednost predstavlja  $\Delta A$ . Prema jednadžbi baždarne krivulje za standard Trolox-a  $\Delta A$  se preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Baždarna krivulja konstruirana za standard Trolox-a prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), a pomoću njezine jednadžbe pavca određuje se antioksidacijski kapacitet uzorka. Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti svih mjerenja uz pripadajuću standardnu devijaciju u mmol Trolox-a/g uzorka. U slučaju da je ekstrakt bilo potrebno razrijediti, dobivena vrijednost množi se sa odgovarajućim faktorom razrjeđenja.

Jednadžba baždarene krivulje za standard Trolox-a:

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

[2]

pri čemu je:

x - koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

### 3.2.2.3 *Određivanje udjela feniletanoidnih glikozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)*

Pojedinačni feniletanoidni glikozidi ehinakozid i verbaskozid identificirani su i kvantificirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s DAD detektorom (Agilent 1100/1200 Series, Agilent, Santa Clara, USA). Razdvajanje komponenti izvršeno je na analitičkoj koloni Zorbax extend C-18 (250×4,5 mm, 5 mikrona) (Agilent Technologies, USA) korištenjem gradijentne elucije: vodene faze A (1 % mravlje kiseline u vodi, v/v) i organske faze B (1 % mravlje kiseline u acetonitrilu, v/v). Protok mobilnih faza iznosio je 1 mL/min pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Duljina trajanja metode iznosila je 52 min uz dodatnih 10 min ekvibracije na početne uvjete metode. Volumen injektiranog uzorka je bio 5 µL. Identifikacija odabranih polifenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena izdvojenih pikova s retencijskim vremenima HPLC standarda, pri maksimumu apsorpcije od 320 nm, dok je kvantifikacija provedena upotrebom jednadžbe standardne krivulje dobivene iz prethodno izrađenih baždarnih krivulja za ehinakozid i verbaskozid (20-100 µg/mL).

### 3.2.3 Inkapsulacija elektroispredanjem

Elektroispredanje je provedeno iz pripremljenih otopina: 10 %-tnog (w/w), 12 %-tnog (w/w) i 15 %-tnog pululana (PUL) (w/w), 5 %-tnog (w/w) i 8 %-tnog (w/w) polietilen oksida (PEO) te otopine 12 %-tnog PUL i 5 %-tnog PEO, pomiješanih u omjeru 1:1 (w/w), u otopljenom liofiliziranom ekstraktu. Pripremljene otopine homogenizirane su 12 h na magnetnoj mješalici pri sobnoj temperaturi prije elektroispredanja.

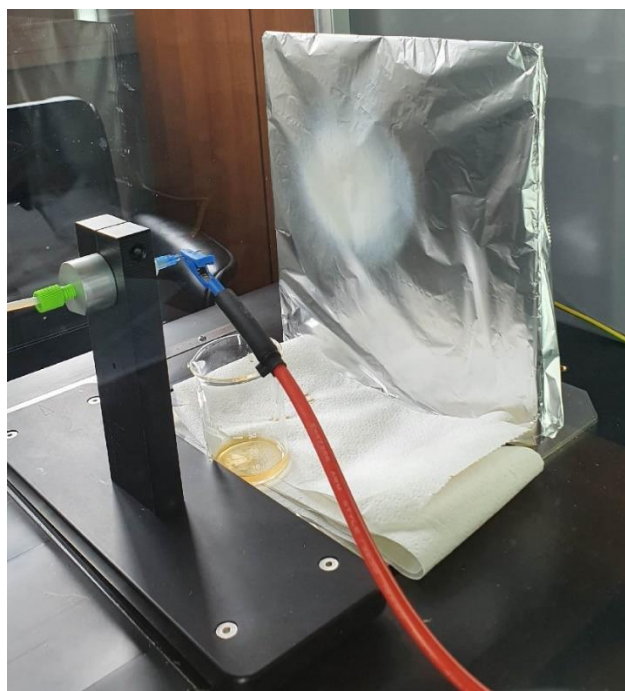
Elektroispredanje pripremljenih otopina polimera provedeno je na uređaju za elektroispredanje Spinbox Systems (Bionicia) (slika 3). Najprije je uvučena odgovarajuća otopina u plastičnu špricu (10 mL), pričvršćenu na pumpu te plastičnom cjevčicom spojenom na jednofaznu glavu od nehrđajućeg čelika sa pričvršćenom iglom veličine 22G (0,7 x 40 mm). Pumpa je isporučila otopinu definiranom brzinom protoka, ovisno o otopini (0,6-1 mL/h). Na iglu je spojeno visokonaponsko napajanje koje prenosi pozitivan naboj u otopinu

polimera. Pod određenim naponom (13,1-21,6 kV) i pri određenim uvjetima provodljivosti, viskoznosti i površinske napetosti otopina, tako električki nabijena otopina formirala je tzv. Taylorov konus- pojavu elongacije polimerne otopine na vrhu igle iz kojeg se formiralo raspršenje otopine. Prilikom raspršenja, kontinuirana vlakna skupljaju se na uzemljenu kolektorsku ploču prekrivenu aluminijskom folijom koja se nalazi na određenoj udaljenosti od vrha igle (10-14 cm), uz istovremeno isparavanje vode iz mlaza (slika 4). Proces elektroispredanja provodio se u rasponu temperature od 25 – 29 °C i relativne vlažnosti između 32 i 41 %, mjerene digitalnim termohigrometrom Boneco 200X.

Nakon provedenog procesa, suha vlakna su uklonjena s aluminijske folije i pohranjena u eksikatoru na sobnoj temperaturi.



**Slika 3.** Spinbox uređaj za elektroispredanje (Anonymous 2, 2023)



**Slika 4.** Vizualni prikaz procesa elektroispredanja (vlastita fotografija)

**Tablica 2.** Parametri procesa elektroispredanja za pripremljene otopine

<b>Polimeri i njihov maseni postotak u konačnoj otopini (%)</b>	<b>protok (mL/h)</b>	<b>primijenjeni napon (kV)</b>	<b>udaljenost do kolektora (cm)</b>	<b>temperatura (°C)</b>	<b>relativna vlažnost (%)</b>
10_PUL	1	21,2	10	26,9	42
12_PUL	1	19-20,5	12	27	38
15_PUL	1	19-21,6	12	26,5	34
12PUL/5PEO (1:1)	0,6	13,1	14	25,9	38
5_PEO	1	15-18	13	28,2	41
8_PEO	0,6	14	14	29,4	32

### 3.2.3.1 Fizikalna karakterizacija (bio)polimernih otopina za elektroispredanje

#### 1) Konduktivnost

Konduktivnost pripremljenih otopina izmjerena je pomoću konduktometra Cond-330i

(WTW) uranjanjem elektrode s integriranim temperaturnim senzorom u otopinu. Vrijednosti se očitavaju nakon potpune stabilizacije mjerenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri paralelna mjerenja uz pripadajuće standardne devijacije.

## 2) Viskoznost

Prividna viskoznost uzoraka mjerena je rotacijskim viskozimetrom Viscometer RM 100 plus pri sobnoj temperaturi ( $25 \pm 0,5$ ). Uzorak (20 mL) se prenese u tijelo uređaja s vanjskim plaštem te se uroni postavljeno cilindrično vreteno koje se tijekom mjerenja konstantno rotira unutar primijenjene otopine. U svrhu održavanja konstantne temperature, korišten je Julabo F 33 rashladni cirkulator grijanja. Mjerenja su se provodila pri brzinama smicanja od 10, 50, 100, 200 i  $300 \text{ s}^{-1}$ . Primjenom metode linearne regresije i temeljem izmjerenih podataka o brzini smicanja i naponu izračunali su se zatim i ostali reološki parametri - indeks tečenja i koeficijent konzistencije. Indeks tečenja iščitava se iz koeficijenta linearne regresije, a koeficijent konzistencije ( $\text{Pas}^n$ ) odgovara antilogaritamskoj vrijednosti konstante linearne regresije vrijednosti smičnog naprezanja i brzine smicanja.

Za izračun reoloških parametara upotrijebjava se Ostwald de Waele-ov zakon:

$$\tau = k \cdot D^n \quad [3]$$

pri čemu je:

$\tau$  - napon smicanja (Pa)

k – koeficijent konzistencije ( $\text{Pas}^n$ )

D – brzina smicanja ( $\text{s}^{-1}$ )

n – indeks tečenja.

Jednadžbu je potrebno linearizirati kako bi se primijenila linearna regresija:

$$\log \tau = \log k + n \cdot \log D \quad [4]$$

Prividna viskoznost izračunava se pomoću Newtonovog zakona:

$$\tau = \mu \cdot D \quad [5]$$

pri čemu je:

$\tau$  - napon smicanja (Pa)

$\mu$  – viskoznost (Pas)

D – brzina smicanja ( $s^{-1}$ ) (Herceg i sur., 2006).

### 3) Površinska napetost

Površinska napetost određena je na tenziometru DCAT s upravljačkom pločom TP 50 i povezanim softverom za analizu podataka (DataPhysics). Korištena je metoda mjerenja Wilhelmyjevom pločicom izrađenom od platine. Minimalno 90 mL otopine se postavi u posudicu sa termoregulacijskim vanjskim plaštem u svrhu održavanja temperature uzoraka ( $25 \pm 0,5$  °C). Kada okomito postavljena pločica dodirne površinu tekućine, na nju djeluje određena sila mjerena senzorom povezanim s pločicom, a koja je u korelaciji s površinskom napetosti i kontaktnim kutom dodira.

#### 3.2.3.2 *Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti nanovlakana*

Inkapsulacijska učinkovitost pripremljenih vlakana definirana je određivanjem udjela ukupnih polifenola TPC metodom i antioksidacijskog kapaciteta gašenjem DPPH slobodnog radikala, kao i određivanjem udjela ehinakozida i verbaskozida. 10 mg uzorka otopljeno je u 10 mL 15 %-tnog (w/v) natrijevog citrata. Za spektrofotometrijske analize, slijepu probu činile se otopine polimera u vodi u istoj koncentraciji kako bi se uklonile potencijalne interferencije samih polimera s korištenim reagensima. Za HPLC analizu, otopina je filtrirana kroz mikrofilter od regenerirane celuloze (veličina pora 0, 25  $\mu$ m). Inkapsulacijska učinkovitost izražena je kao omjer udjela polifenola u početnoj otopini i otopini nanovlakana u 15 %-tnom (w/v) natrijevom citratu, uzimajući u obzir suhu tvar ulazne otopine i novokreiranih nanovlakana.

#### 3.2.3.3 *Morfološka karakterizacija nanovlakana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)*

##### Princip:

Skenirajuća/pretražna elektronska mikroskopija (SEM) predstavlja tehniku koja omogućuje vizualizaciju i karakterizaciju heterogenih materijala na mikrometarskoj i nanometarskoj razini. SEM mikroskop skenira površinu uzorka precizno fokusiranim snopom elektrona koji izbija sekundarne elektrone iz uzorka. Konverzijom u električne signale, nastaje realna slika

morfologije uzorka pomoću fotomultiplikacijskog detektora.

#### Postupak rada:

Morfologija vlakana određena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na mikroskopu TESCAN CAN Mira3. Vlakna su pričvršćena na nosače korištenjem dvostruko ljepljive trake te su prekrivena slojem zlata u cilju osiguranja električne provodljivosti. Skeniranje je provedeno primjenom napona od 10 kV. Dobivene slike snimane su pod povećanjem  $\times 10000$ .

#### 3.2.4 *In vitro* digestija

INFOGEST statični protokol *in vitro* digestije proveden je prema Minekus i sur. (2014) te Brodkorb i sur. (2019). Najprije su pripremljene puferne otopine odgovarajućih soli i odgovarajuće pH vrijednosti za simuliranu želučanu fazu- SGF (pH=3) i simuliranu intestinalnu fazu- SIF (pH=7). Simulacija želučane faze započeta je otapanjem uzorka nanovlakana (0, 2 g) u 40 mL SGF pufera s pepsinom (2000 U/mL na ukupan volumen pufera) uz trajanje od 2 sata. Tijekom procesa, temperatura je strogo održavana na 37 °C u vodenoj kupelji mjerenjem pomoću kontaktnog termometra. Uzorkovanje za HPLC analizu otpuštenih feniletanoidnih glikozida (0,5 mL) je provedeno nakon 5, 10, 15, 30, 60 i 120 min digestije. Svakih 0,5 mL uzorka otopljenog u pufernoj otopini je zamijenjeno istim volumenom svježeg puferne otopine. Nakon završetka, cjelokupan volumen SGF-a (40 mL) je pomiješan sa 40 mL SIF medija koji je prethodno termostatiran na 37 °C, uz prisutnost pankreatina (1 mg/mL na ukupni volumen- SGF+SIF). Uzorkovanje za HPLC analizu otpuštenih feniletanoidnih glikozida (0,5 mL) je provedeno nakon 125, 135 i 150 min. Na isti način je provedena *in vitro* digestija liofiliziranog ekstrakta (Minekus i sur., 2014).

#### 3.2.5. Obrada podataka

Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA one way) uz razinu značajnosti od 5 % ( $p < 0,05$ ) korištena je za statističku analizu dobivenih vrijednosti inkapsulacijske učinkovitosti u TIBCO Statistica 13.2 programu.

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu cilj je inkapsulirati polifenolni ekstrakt trave ive elektroispređanjem uz nosače pululan i polietilen oksid te proizvesti nanovlakna koja bi se mogla koristiti u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

U tu svrhu napravljena je karakterizacija bioaktivnog sastava vodenog biljnog ekstrakta i fizikalna karakterizacija pripremljenih sustava nosača te je pripremljeno je 6 uzoraka nanovlakana kojima je određen inkapsulacijski potencijal i morfološke karakteristike te je praćena kinetika otpuštanja dominantnih polifenolnih spojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

### 4.1 Određivanje bioaktivnog sastava ekstrakta trave ive

Za karakterizaciju bioaktivnog potencijala trave ive korištene su spektrofotometrijske metode određivanja udjela ukupnih polifenola te antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom. Za kvantifikaciju dva dominantna feniletanoidna glikozida: ehinakozida i verbaskozida korištena je HPLC metodologija. Rezultati su prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3.** Bioaktivna karakterizacija vodenog ekstrakta *T. montanum* pripremljenog konvencionalnom ekstrakcijom

	<b>TPC</b> (mg GAE/L )	<b>DPPH</b> (mmol TroloxE/L)	<b>ECH</b> (mg/L)	<b>VERB</b> (mg/L)
TM_E	550.2 ± 30	0.33±6.9	179.9±0.96	51.4±0.12
TM_E;10×	5700.5±50	3.26±5.4	1730.6±1.96	498.9±0.56

TM\_E: ishodišni vodeni ekstrakt koji se podvrgavao uparavanju; TM\_E;10×: ~10 puta koncentrirani vodeni ekstrakt; ECH: ehinakozid; VERB: verbaskozid

Prema dobivenim rezultatima (tablica 3) vidljivo je da se približno 32 % udjela TPC-a može pripisati ehinakozidu, dok se 9 % odnosi na udio verbaskozida u biljnom ekstraktu. Stoga se može zaključiti da se ekstrakt trave ive pokazao kao relativno bogat izvor feniletanoidnih glikozida. Ehinakozid koji se u *T. montanum* nalazi u znatno većem udjelu od verbaskozida zastupljen je samo u trima vrstama roda *Teucrium*, dok je verbaskozid nađen čak u 12 vrsta



istog roda (Stanković i sur., 2020).

#### 4.2 Fizikalna karakterizacija (bio)polimernih otopina za elektroispredanje

Konduktivnost, površinska napetost i viskoznost parametri su kojima se mogu karakterizirati otopine polimera budući da utječu na ukupni potencijal formiranja Taylor-ovog konusa i, posljedično, pravovaljano raspršenje mlaza polimerne otopine. Konduktivnost pokazuje gustoću naboja otopine polimera i ovisi o vrsti polimera/otapala, koncentraciji polimera/otapala, temperaturi, pa čak i anionskim solima te tako utječe na morfologiju vlakana/veličinu čestica. Površinska napetost je glavna sila koja se suprotstavlja električnom naponu tijekom elektrohidrodinamičke obrade i definira elektroispredanje otopine polimera. Parametri koji utječu na površinsku napetost otopine su vrsta otapala, maseni omjer otapala i temperatura. Što je veća površinska napetost, veći je minimalni napon za generiranje elektroispredanih nanovlakana, ali ne uvijek linearno (Rostamabadi i sur., 2020).

**Tablica 4.** Fizikalni parametri ekstrakta i sustava nosača, otopljenih u vodi ili ekstraktu

<b>Uzorak</b>	<b>konduktivnost (mS/cm)</b>	<b>površinska napetost (mN/m)</b>
10 % PUL_H2O	0,059±0,00	59,22±0,29
12 % PUL_H2O	0,065±0,00	58,45±0,41
15 % PUL_H2O	0,121±0,00	60,46±1,12
5 % PEO_H2O	0,331±0,01	58,61±0,22
8 % PEO_H2O	0,931±0,00	57,45±0,23
12PUL:5PEO (1:1)_H2O	0,110±0,00	58,89±0,14
10 % PUL_E	2,285±0,01	38,37±0,23
12 % PUL_E	2,160±0,00	38,78±0,48
15 % PUL_E	1,683±0,05	37,79±0,93
5 % PEO_E	2,595±0,01	39,26±0,35
8 % PEO_E	2,225±0,02	39,06±0,09
12 PUL:5 PEO (1:1)_E	2,345±0,01	38,88±0,02
EKSTRAKT	3,365±0,01	55,84±1,02

Iz dobivenih rezultata (tablica 4) vidljivo je da je ekstrakt utjecao na promjenu

konduktivnosti i površinske napetosti polimernih otopina usporedno s rezultatima vodenih otopina polimera.

Međutim, iako su i vrijednosti konduktivnosti slične i za PUL i za PEO otopine u ekstraktu, otopine s PEO kao polimerom nisu se ispredale. U tom slučaju valja istaknuti i utjecaj viskoznosti budući da je otopina 8 %-tnog PEO u ekstraktu bila izrazito viskozna, no, čak i kod manje viskozne 5 %-tnog PEO također nije došlo do ispredanja. Jedan od mogućih razloga tome može biti i neprikladna molekulska masa polimera. Naime, Rostamabadi i sur. (2020) naveli su da može doći do poboljšanja potencijala elektroispredanja mijenjanjem fizikalnih karakteristika otopina biopolimera, posebno stupnja isprepletenosti/povezanosti lanaca ili smanjenjem električne vodljivosti otopina, kao i da za učinkovito elektroispredanje molekulska masa mora biti veća od 200 kDa. Molekulska masa korištenog PEO iznosi 300 kDa što načelno odgovara tvrdnji Rostambadija i sur., no budući da gornja granica nije određena, postoji mogućnost da je molekulska masa previsoka, tj. da između iznosa od 200 i 300 kDa postoji raspon optimalne molekulske mase nakon kojeg kreće trend smanjivanja.

Nadalje, veća viskoznost polimera i veće viskoelastične sile uzrokuju teško izbacivanje mlaza ili stvaranje većih vlakana. Niža viskoznost polimera i niže viskoelastične sile (gdje je površinska napetost dominantan čimbenik) uzrokuju proizvodnju kuglica ili zrnatih vlakana. Viskoznost dovodne otopine treba biti dovoljno visoka da spriječi raspadanje mlaza na kapljice i dovoljno niska za stvaranje kontinuiranih i glatkih vlakana (Rostamabadi i sur., 2020). U tablici 5 prikazani su reološki parametri uzoraka polimera otopljenih u vodi te polimera otopljenih u ekstraktu izračunati preko Ostwald de Waele-ovog zakona.

**Tablica 5.** Reološki parametri ekstrakta i sustava nosača, otopljenih u vodi ili ekstraktu

<b>Uzorak</b>	<b>prividna viskoznost (Pas)*</b>	<b>koef. konzistencije (k)</b>	<b>indeks tečenja (n)</b>
10 % PUL_H2O	0,132±0,02	0,0101	0,793
12 % PUL_H2O	0,229±0,21	0,0117	0,802
15 % PUL_H2O	0,585±0,05	0,0184	0,9811
5 % PEO_H2O	0,490±0,08	0,0231	0,8074
8 % PEO_H2O	3,920±1,95	0,2361	0,6957
12PUL:5PEO_H2O	0,331±0,05	0,0175	0,7596
10 % PUL_E	0,147±0,22	0,0089	0,7069

12 % PUL_E	0,291±0,03	0,0117	0,8774
15 % PUL_E	0,791±0,12	0,1651	0,962
5 % PEO_E	0,382±0,15	0,019	0,8567
8 % PEO_E	3,959±1,04	0,2286	0,7187
12PUL:5PEO_E	0,350±0,04	0,0137	0,8877
EKSTRAKT	0,023±0,01	0,0478	0,2801

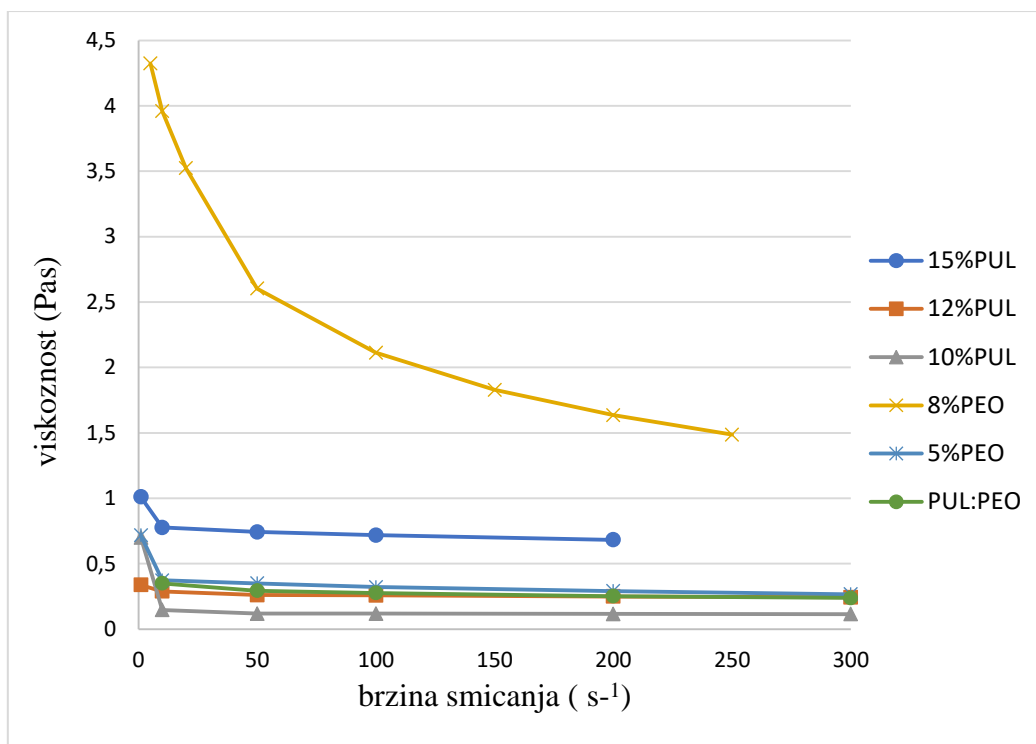
\*prividna viskoznost mjerena je pri brzini smicanja od  $10\text{s}^{-1}$

Reološka svojstva ispitivanih uzoraka prikazana su pomoću koeficijenta konzistencije ( $k$ ) i indeksa tečenja ( $n$ ) budući da je prividna viskoznost promjenjiva veličina. Iz podataka za indeks tečenja, koji je kod svakog uzorka manji od 1, može se zaključiti da svi uzorci pokazuju ponašanje pseudoplastičnih otopina.

Primjenjivane su brzine smicanja širokog raspona kako bi se što preciznije odredili ovi parametri. Tako je brzina smicanja za većinu otopina polazila od  $1\text{ s}^{-1}$  te su primjenjivane redom brzine od 10, 50, 100, 200 i  $250\text{ s}^{-1}$ . Kod 12 %-tnog i 15 %-tnog pululana u vodi mjerena je viskoznost za brzinu smicanja od  $800\text{ s}^{-1}$  iz razloga što je raspon dobivenih vrijednosti prividne viskoznosti sporo padao, dok je kod nekih otopina početak bio s brzinom smicanja od 5 ili  $10\text{ s}^{-1}$  zbog preniske viskoznosti za brzinu smicanja od  $1\text{ s}^{-1}$ .

Na slici 8 prikazana je ovisnost viskoznosti i brzine smicanja otopina polimera u ekstraktu te može se uočiti kako se viskoznost smanjuje povećanjem brzine smicanja. Također, ovisnost viskoznosti i brzine smicanja za polimere otopljene u ekstraktu se značajno ne razlikuje od ovisnosti viskoznosti i brzine smicanja za polimere otopljene u vodi, stoga se može zaključiti da dodatak ekstrakta ne utječe na viskoznost otopina. Otopina 8 %-tnog PEO imala je previsoku prividnu viskoznost koja je onemogućavala kontinuirani mlaz zbog jakih elektrostatskih sila.

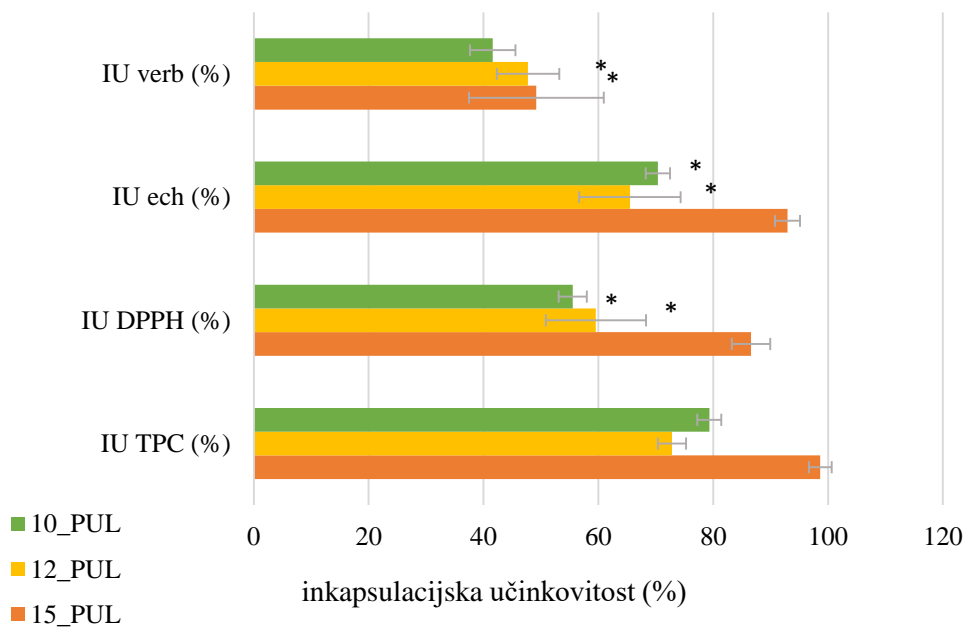
Za poboljšanje reoloških svojstava i proizvodnju kvalitetnijih vlakana kojima je lakše upravljati moguće je kreirati binarne ili ternarne sustave polimera kako bi se olakšalo i optimiziralo elektroispredanje. Tako su Vicini i sur. (2018) koristili binarne i ternarne sustave dodavanjem PEO, uz biopolimere alginata i hijaluronske kiseline zbog njihove niske viskoznosti i nemogućnosti formiranja Taylor-ovog stošca. Naknadnim kreiranjem krivulja viskoznosti navedenog binarnog i ternarnog sustava, uočen je porast viskoznosti i omogućeno je elektroispredanje početnih biopolimera.



**Slika 5.** Prikaz ovisnosti viskoznosti o brzini smicanja za polimere otopljene u ekstraktu

### 4.3 Inkapsulacijska učinkovitost

Inkapsulacijska učinkovitost (IU, %) formiranih vlakana određena je samo na uzorcima 10\_PUL, 12\_PUL i 15\_PUL, obzirom da su jedini imali potencijal odvajanja sa aluminijske folije, dok se uzorci pripremani s PEO i kombinacijom PUL i PEO nisu mogli prikladno odvojiti s prijanjajuće podloge. IU je definirana primjenom TPC i DPPH metodologije te analizom pojedinačnih polifenolnih spojeva, tj. ehinakozida i verbaskozida u otopini vlakana u odnosu na njihov udio u izvornoj otopini, uzimajući u obzir udio suhe tvari u izvornoj otopini polimera i u formiranim vlaknima. Prema dobivenim rezultatima TPC-a (slika 9), učinkovitost inkapsulacije za uspješno elektroispredena vlakna u sva tri uzorka formiranih vlakana bila je visoka (72,80 - 98,65 %). Najveći antioksidacijski potencijal, određen DPPH metodom, ima uzorak na bazi 15 %-tnog pululana (86,59 %).



**Slika 6.** Inkapsulacijska učinkovitost elektroispređenih vlakana određena na osnovu TPC-a, antioksidacijskog kapaciteta (DPPH) i udjela ehinakoizida (ech) i verbaskoizida (verb)

Rezultati označeni sa \* nisu statistički značajni ( $p > 0,05$ ).

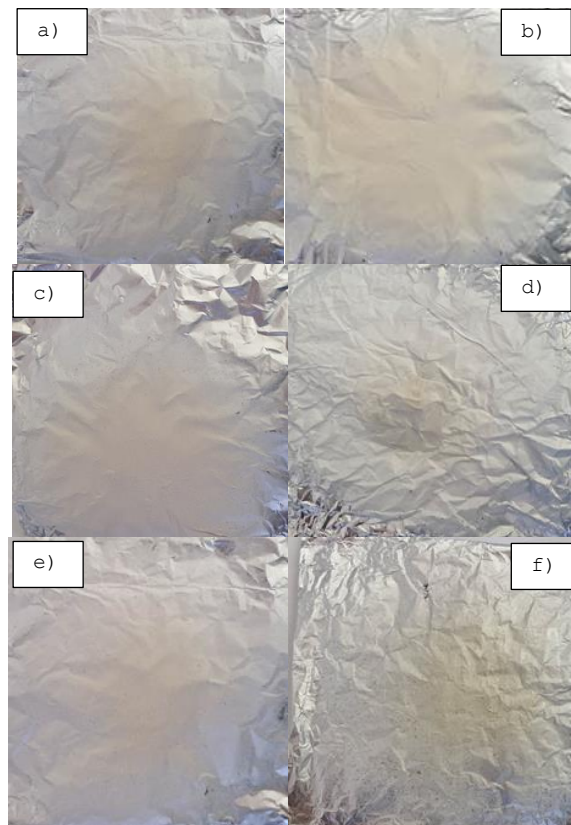
Također, ehinakoizid je inkapsuliran u većem udjelu u sva tri uzorka (65,37-92,92 %) u odnosu na verbaskoizid (41,6-49,21 %). Uzevši u obzir sva ova četiri mjerena parametra, vlakna formirana s 15\_ PUL pokazala su najbolji inkapsulacijski potencijal. Udio verbaskoizida za tako formirana vlakna iznosio je 49, 21 %, udio ehinakoizida 92,92 %, a inkapsulacijska učinkovitost određena na osnovu antioksidacijskog kapaciteta (DPPH) iznosila je 86,58 %, dok je ona na osnovu TPC-a iznosila 98,65 %.

Wen i sur. (2017) proizveli su hibridna vlakna na bazi pululana s izolatom proteina amaranta koja se obično proizvode za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva povećane stabilnosti i bioaktivnosti. Na primjeru nizina, jednog od inkapsuliranih izolata proteina korištenih u ovom eksperimentu, dokazali su kako se inkapsulacijom i proizvodnjom amarant/pululanskih nanovlakana održala njegova antimikrobna aktivnost. Prosječni promjeri vlakana smanjivali su se s povećanjem udjela nizina. Vlakna koja su sadržavala 20 mg/mL nizina postigla su učinkovitost inkapsulacije od 95 % s dobrim antimikrobnim djelovanjem protiv *L. mesenteroides*, što ukazuje na potencijalnu primjenu kao jestivih filmova ili materijala za pakiranje u prehrambenoj industriji. Također, u amarant/pululanska vlakna inkapsulirana je i folna kiselina s visokim inkapsulacijskom učinkovitošću  $> 95$  %. Osim toga, inkapsulacija

folne kiseline unutar vlakana povećala je njihovu toplinsku stabilnost i zaštitila ih od razgradnje nakon izlaganja ultraljubičastom (UV) zračenju.

Stoga bi se u nastavku istraživanja pululan mogao pomiješati s drugim polisaharidima ili proteinima radi poboljšanja fizikalnih svojstava i učinkovitosti inkapsulacije.

#### 4.4 Morfološka karakterizacija nanovlakana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)

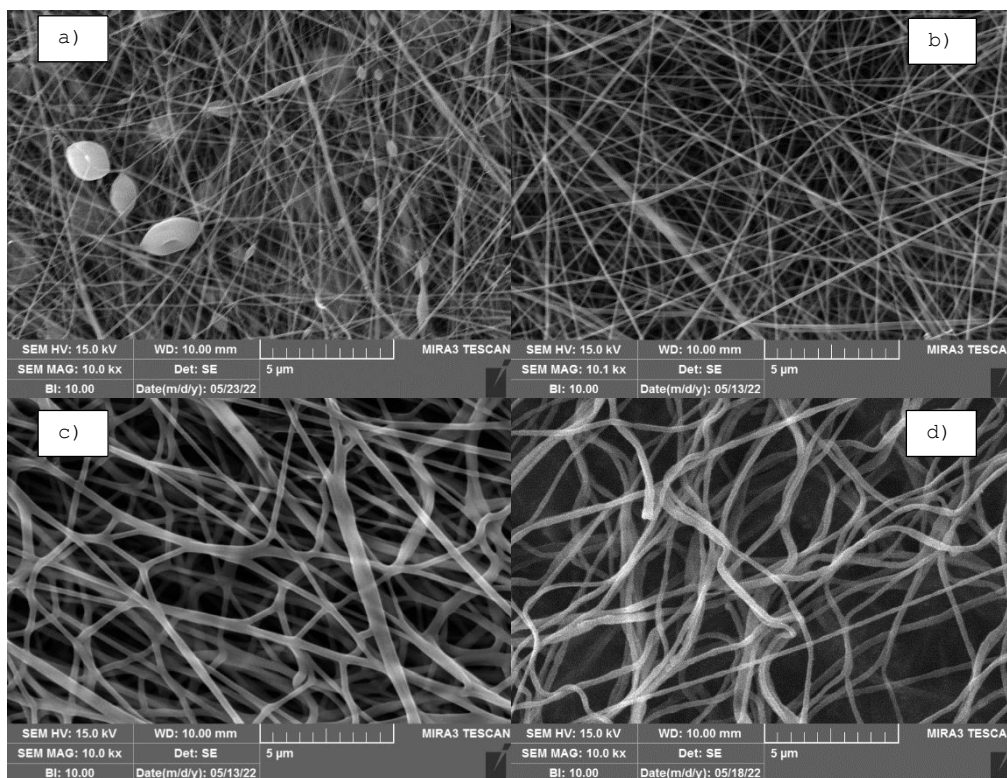


**Slika 7.** Elektroispredena vlakna ekstrakta trave ive;

a) 10\_PUL, b) 12\_PUL, c) 15\_PUL, d) 12PUL/5PEO (1:1), e) 5\_PEO, f) 8\_PEO

Na slici 7 prikazana su elektroispredena vlakna ekstrakta trave ive s korištenim nosačima PUL i PEO i njihove kombinacije u rasponu korištenih koncentracija pri čemu je vidljivo da su svi uzorci dobro ispredani formirajući ujednačeni sloj vlakana na aluminijskoj podlozi.

Za određivanje morfologije nanovlakana provedena je mikroskopska analiza (SEM) i na uzorcima 10\_PUL, 12\_PUL i 15\_PUL te na 12PUL/5PEO (1:1) (iako uzorak 12PUL/5PEO (1:1) nije bio adekvatan za analitičke svrhe, mogao se iskoristiti za uvid u morfologiju potencijalno dobivene nanostrukture).



**Slika 8.** SEM prikaz elektroispredjenih nanovlakana s biljnim ekstraktom;

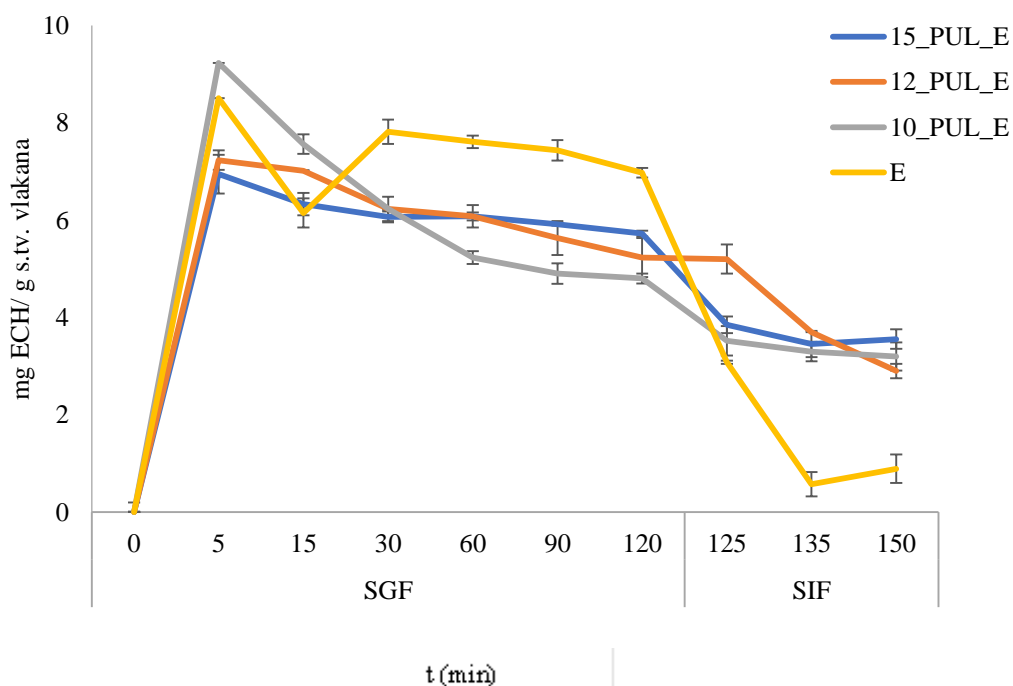
a) 10\_PUL, b) 12\_PUL, c) 15\_PUL, d) 12PUL/5PEO (1:1)

Na slici 8 uočeno je kako nanovlakna na bazi PUL i PUL/PEO pokazuju različitu morfologiju, pri čemu vlakna s 12\_PUL i 15\_PUL pokazuju ravnu i nasumično orijentiranu strukturu s minimalnom poroznošću, dok je 10\_PUL pokazao zrnatu strukturu s izraženom poroznošću nekontinuiranih vlakana zajedno s zrcima. To je rezultat prijelaza s elektroispredanja na elektrosprejanje i obično se događa kada je viskoznost, tj. koncentracija polimera preniska za tvorbu vlakana. U slučaju PUL/PEO nanovlakana, struktura nije kontinuirana te su vlakna djelomično međusobno povezana i relativno isprekidana, a to rezultira visokim upijanjem vode i čvrstim prijanjanjem na aluminijsku foliju. Drosou i sur. (2017) istraživali su utjecaj svojstava otopina i uvjeta procesa na promjer i morfologiju vlakana proizvedenih iz različitih mješavina proteina sirutke i pululana. Zaključili su da je jedan od najvažnijih čimbenika koji utječu na veličinu i morfologiju vlakana bio omjer pululana i proteina sirutke u otopini. Proizvodili su uzorke s različitim udjelima pululana od 20 do 80 % mase u odnosu na mješavinu proteina sirutke pri istoj brzini protoka, primijenjenom naponu i udaljenosti od kolektora. Kontinuirana vlakna promjera oko 231 nm dobivena su iz proteina sirutke i pululana u omjeru 20:80, 30:70 i 50:50. Otopina s pululanom

i proteinima sirutke u omjeru 50:50 koja sadrži samo 10 % težine pululana u otopini za punjenje, dovodi do ujednačenih nanovlakana bez zrnaca koja bi se mogla pripisati poboljšanom molekularnom uplitanju kroz interakcije između oba biopolimera. Otopina koja je sadržavala 70 % proteina sirutke dala je elektroispredeno vlakno s defektima kuglica, a kada je udio proteina sirutke bio najveći u odnosu na udio pululana, dominantna je postala perlata morfologija.

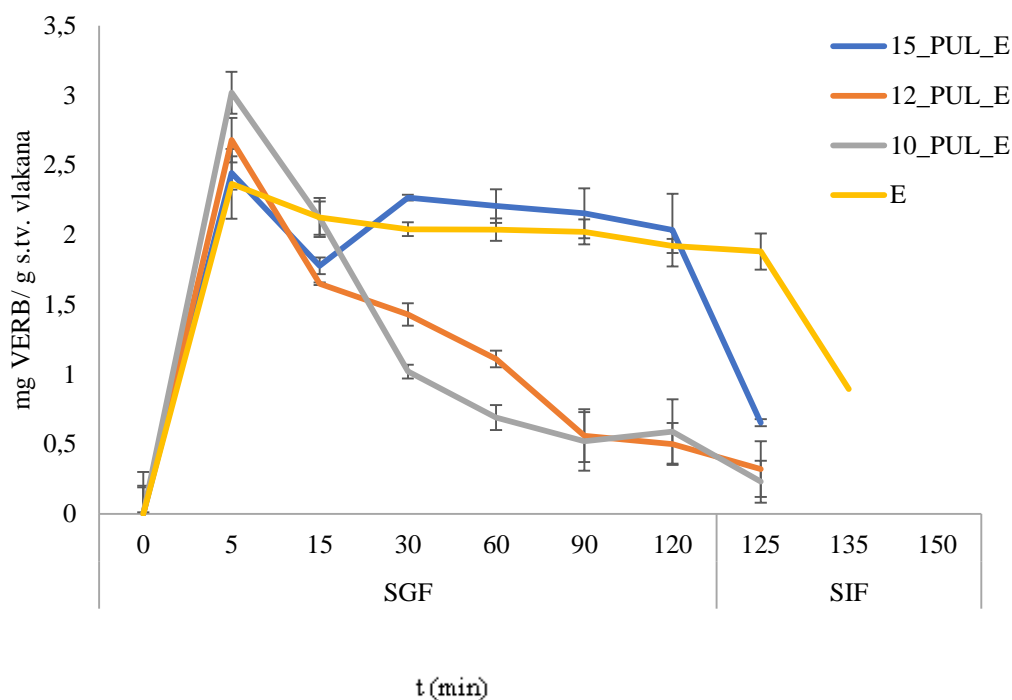
#### 4.5 In vitro digestija

In vitro digestija je metoda kojom se simuliraju uvjeti probavnog procesa kod ljudi. Nanovlakna su otopljena u odgovarajućim otopinama (SGF i SIF) te je provedena HPLC analiza u kojoj su u uzorcima izuzimanim unutar određenog vremenskog perioda u gastro, a potom u intestinalnim uvjetima, kvantificirani spojevi ehinakozid i verbaskozid kako bi se pratila kinetika njihovog otpuštanja iz formiranih vlakana (slike 9 i 10).



**Slika 9.** Kinetika otpuštanja ehinakozida u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava





**Slika 10.** Kinetika otpuštanja verbaskozida u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava

Za uspješan postupak inkapsulacije poželjno je postepeno otpuštanje bioaktivnih spojeva u SGF i SIF uvjetima, što znači da bi krivulja na početku trebala postepeno rasti. Prema dobivenim rezultatima (slika 9 i 10) vidi se da su se bioaktivni spojevi otpustili već u prvih 5-10 minuta što nije posve zadovoljavajući rezultat tako da bi sustav nosača u nastavku istraživanja trebalo unaprijediti kombinacijom s drugim polimerima, dodatkom soli, dodatkom hidrofobnog polimera, poput zeina i slično (Jacobs i sur., 2010).

Primjer uspješne inkapsulacije praćene in vitro digestijom je rad Isik i sur. (2018) koji su elektroispredanjem sa želatinom ili želatin-laktalbuminom inkapsulirali polifenole koncentrata višnje i njihov udio se smanjio nakon intestinalnog trakta, dok su svi elektroispredani uzorci pokazali poboljšanu biopristupačnost. Ovo smanjenje može se objasniti visokim pH tijekom intestinalne faze, što može uzrokovati razgradnju polifenola koncentrata višnje. Prema dobivenim rezultatima inkapsulacija elektroispredanjem pružila je 8 puta bolju zaštitu u usporedbi s neinkapsuliranim koncentratom višnje.

## 5 ZAKLJUČCI

1. Vodeni ekstrakt trave ive može se smatrati bogatim izvorom feniletanoidnih glikozida ehinakozida i verbaskozida.
2. Unatoč utjecaju velikog broja čimbenika, tehnika elektroispredanja uspješno je primijenjena za dobivanje nanovlakana bogatih polifenolima trave ive, uz pululan kao nosač.
3. Otopine ekstrakta s PEO kao polimerom nisu se uspjele elektroispredati zbog nemogućnosti formiranja stabilnog mlaza koji uzrokuju neoptimalna vodljivost i viskoznost otopine.
5. Otopina pululana u udjelu od 12 i 15 % pokazala je relativno visoku učinkovitost inkapsulacije i odgovarajuću morfologiju vlakana.
6. Za otopinu PUL\_15 inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenola iznosila 98,65 %, a ehinakozida 92,92 %.
7. U nastavku istraživanja potrebna su dodatna unaprjeđenja uvjeta elektroispredanja, a posebice optimizacija sustava nosača (kombinacija pululana s drugim odgovarajućim polisaharidima ili nekim biljnim proteinima) i njihovih fizikalnih parametara kako bi se poboljšala struktura nanovlakana i omogućilo sporije otpuštanje feniletanolidnih glikozida u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

## 6 LITERATURA

Agrahari V, Agrahari V, Meng J, Mitra AK (2017) Electrospun Nanofibers in Drug Delivery: Fabrication, Advances, and Biomedical Applications. U: Mitra A, Cholkar K, Mandal A (ured.) In Emerging nanotechnologies for diagnostics, drug delivery and medical devices, Elsevier, Amsterdam, str. 189-215.

Aguilar-Vázquez G, Loarca-Piña G, Figueroa-Cárdenas JD, Mendoza S (2018) Electrospun fibres from blends of pea (*Pisum sativum*) protein and pullulan. *Food Hydrocoll* **83**, 173–181.

Alchera F, Ginepro M, Giacalone G (2022) Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Blackcurrant By-Products and Possible Uses of the Extracts in Active Packaging. *Foods* **11**(18), 2727.

Alipieva K, Korkina L, Erdogan Orhan I, Georgiev MI (2014) Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance, *Biotechnol Adv* **32**, 1065-1076.

Anonymus 1 (2023) <<https://durmitor.wordpress.com/2011/07/01/trava-iva-teucrium-montanum/>> Pristupljeno 23.2.2023.

Anonymus 2 (2023) <<https://bioinicia.com/bioinicia-presents-its-new-system-spinbox/>> Pristupljeno 3.2.2023.

Badran R, Gharios R, Tehrani-Bagha A (2019) Water-based electrospinning. U: Horzum N, Demir M, Muñoz-Espí R, Crespy D (ured.) Green Electrospinning, De Gruyter, Berlin, str. 129-156.

Banik S, Mukherjee R, Ghosh P, Karmakar S, Chatterje S (2018) Estimation of plant pigments concentration from tulsi (*Ocimum sanctum* L.): a six months study. *J Pharmacogn Phytochem* **7**, 2681 – 2684.

Bannikova A, Zyainitdinov D, Evteev A, Drevko Y, Evdokimov I (2020) Microencapsulation of polyphenols and xylooligosaccharides from oat bran in whey protein-maltodextrin

complex coacervates: In-vitro evaluation and controlled release. *Bioact Carbohydr Diet Fibre* **23**, 100236. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100236>

Bhardwaj N, Kundu SC (2010) Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* **28**, 325–347.

Blanco-Padilla A, López-Rubio A, Loarca-Piña G, Gómez-Mascaraque LG, Mendoza S (2015) Characterization, release and antioxidant activity of curcumin-loaded amaranth-pullulan electrospun fibres. *LWT - Food Sci Technol* **63**, 1137-1144.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* **28**, 25 – 30.

Cegledi E, Elez Garofulić I, Zorić Z, Roje M, Dragović-Uzelac V (2022) Effect of Spray Drying Encapsulation on Nettle Leaf Extract Powder Properties, Polyphenols and Their Bioavailability. *Foods* **11**(18), 2852. <https://doi.org/10.3390/foods11182852>

Coman MM, Oancea AM, Verdenelli MC i sur. (2018) Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts. *Eur Food Res Technol* **244**, 735–745. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2997-9>

Cutrim CS, Alvim ID, Cortez MAS (2019) Microencapsulation of green tea polyphenols by ionic gelation and spray chilling methods. *J Food Sci Technol* **56**, 3561–3570. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03908-1>

Dajić Stevanović Z, Stešević D, Pljevljakušić D (2013) Regionalni priručnik za sakupljače ljekovitog bilja. 1. izd., općina Plužine i općina Ljubvija. str. 80.

Dehghani F, Annabi N (2011) Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Curr Opin Biotechnol* **22**(5), 661-666.

Ding F, Deng H, Du Y, Shi X, Wang Q (2014) Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale* **6**(16), 9477-9493.

Drosou C, Krokida M, Biliaderis CG (2017) Composite pullulan-whey protein nanofibres made by electrospinning: Impact of process parameters on fibre morphology and physical properties. *Food Hydrocoll*, **77**, 726–735.

Djilas SM, Markov SL, Cvetković DD, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS, Tumbas VT (2006) Antimicrobial and free radical scavenging activities of *Teucrium montanum*. *Fitoterapia* **77**, 401-403.

Elsabee MZ, Naguib HF, Morsi RE (2012) Chitosan based nanofibers review. *Mat Sci Eng C-Mater* **32**, 1711–1726.

Estevez-Areco S, Guz L, Candal R, Goyanes S (2018) Release kinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) polyphenols from polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibers in several food simulants. *Food Packag Shelf Life*, **18**, 42–50.

Herceg Z, Krešić G, Bačić M, Juraga E (2006) Reološka i termofizička svojstva modelnih sustava karagenana i  $\beta$ -laktoglobulina tretiranih visokim hidrostatskim tlakom. *Mljekarstvo* **56** (1), 67-81.

Isik BS, Altay F, Capanoglu E (2018) The uniaxial and coaxial encapsulations of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) concentrate by electrospinning and their in vitro bioaccessibility. *Food Chem*, **265**, 260-273.

Jacobs V, Anandjiwala RD, Maaza M (2010) The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers, *J Appl Polym Sci* **115**, 3130–3136.

Klossner RR, Queen HA, Coughlin AJ, Krause WE (2008) Correlation of chitosan's rheological properties and its ability to electrospin. *Biomacromolecules* **9**(10), 2947-2953.

Krishnan R, Sundarrajan S, Ramakrishna S (2013) Green processing of nanofibers for regenerative medicine. *Macromol Mater Eng* **298**, 1034–1058.

Kuntzler SG, de Almeida ACA, Costa JAV, de Morais MG (2018) Polyhydroxybutyrate and

phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. *Int J Biol Macromol* **113**, 1008–1014.

Lakušić B, Stevanović B, Jančić R, Lakušić D (2009) Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (Lamiaceae) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro). *Flora* **205**, 633-646.

Leidy R, Maria Ximena QC (2019) Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations. *Trends Food Sci Technol* **85**, 92-106.

Liang D, Hsiao BS, Chu B (2007) Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1392–1412.

Lin L, Zhu Y, Cui H (2018) Electrospun thyme essential oil/gelatin nanofibers for active packaging against *Campylobacter jejuni* in chicken. *Food Sci Technol* **97**, 711–718.

Minekus M, Alminger 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 Funct* **5**, 1113-1124.

de Moura SCSR, Schettini GN, Garcia AO, Gallina DA, Alvim ID, Hubinger MD (2019) Stability of Hibiscus Extract Encapsulated by Ionic Gelation Incorporated in Yogurt. *Food Bioprocess Technol* **12**, 1500–1515. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02308-9>

Naczka M, Shahidi F (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharmaceut Biomed* **41**, 1523–1542.

Nagy ZK, Balogh A, Demuth B, Pataki H, Vigh T, Szabo B i sur. (2015) High speed electrospinning for scaled-up production of amorphous solid dispersion of itraconazole. *Int J Pharm* **480**, 137–142.

Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Morais S, Barroso MF, Moreira MM (2018) Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum*

L.). *J Supercrit Fluid* **138**, 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.04.019>

Nedović V, Kalusević A, Manojlović V, Lević S, Bugarski B (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci* **1**, 1806 – 1815

Ngwuluka NC, Abu-Thabit NY, Uwaezuoke OJ, Erebor JO, Ilomuanya MO, Mohamed RR i sur. (2020) Natural Polymers in Micro- and Nanoencapsulation for Therapeutic and Diagnostic Applications: Part I: Lipids and Fabrication Techniques. U: Abu-Thabit N (ured.) Nano- and Microencapsulation, IntechOpen, London

Niki E (2010) Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* **49**, 503-515.

Park JS (2011) Electrospinning and its applications. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* **1**, 043002

Petrović D (2014) Trava iva od mrtva pravi živa. *Pčela* **6**, 7-8.

Poudel D, Swilley-Sanchez S, O'keefe S, Matson J, Long T, Fernández-Fraguas C (2020) Novel Electrospun Pullulan Fibres Incorporating Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin: Morphology and Relation with Rheological Properties. *Polymers* **12**(11), 2558.

Qin ZY, Jia XW, Liu Q, Kong B, Wang H (2019) Fast dissolving oral films for drug delivery prepared from chitosan/pullulan electrospinning nanofibres. *Int J Biol Macromol* **137**, 224–231.

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L (2011) Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew Chem Int Ed* **50**, 586-621.

Ribeiro AM, Estevinho BN, Rocha F (2019) Evaluating the Release and Stability of Phenolic Compounds in Encapsulated Powders. *Food Bioproc Techn* **12**, 1381–1394

Rostamabadi H, Assadpour E, Tabarestani HS, Falsafi SR, Jafari SM (2020) Electrospinning approach for nanoencapsulation of bioactive compounds; recent advances and innovations.

*Trends Food Sci Technol* **100**, 190-209.

Shao P, Niu B, Chen H, Sun P (2018) Fabrication and characterization of tea polyphenols loaded pullulan-CMC electrospun nanofiber for fruit preservation. *Int J Biol Macromol* **107**, 1908–1914. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.054>.

Sharma R, Singh H, Joshi M, Sharma A, Garg T, Goyal AK (2014) Recent advances in polymeric electrospun nanofibers for drug delivery. *Crit Rev Ther drug Carrier Syst* **31**(3), 187-217.

Singh RS, Kaur N, Kennedy JF (2019) Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. *Carbohydr Polym* **217**, 46–57.

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Meth Enzymol* **299**, 152.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144 – 158.

Stanković MS, Niciforović N, Topuzović M, Solujić S (2011) Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, F. *Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnol Biotechnol Equip* **25**, 2222-2227.

Stanković M, Stefanović O, Čomić L, Topuzović M, Radojević I, Solujić S (2012) Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Open Life Sci* **7**, 664-671.

Stanković M (2020) *Teucrium Species: Biology and Applications*, Springer.

Tavares da Silva F, Furtado da Cunha K, Fonseca LM, Dias Antunes M, Mello El Halal SL, Fiorentini ÂM i sur. (2018) Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. *Int J Biol Macromol* **118**, 107–115.



Tian XY, Li MX, Lin T, Qiu Y, Zhu YT, Li XL i sur. (2020) A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides. *Eur J Med Chem* **209**, 112563.

Torkamani AE, Abidin SZ, Hani NM, Mahmood WAK, Juliano P (2017) Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from *Momordica charantia* fruit within zein/gelatin shell core fibers via coaxial electrospinning. *Food Biosci* **21**, 60-71.

Tsao R (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**(12), 1231-1246.

Tumbas VT, Mandić AI, Četković GS, Đilas SM, Čanadanović-Brunet JM (2004) HPLC analysis of phenolic acids in Mountain germander (*Teucrium montanum* L.) extracts. *Acta Period Technol* **35**, 265-273.

Vicini S, Mauri M, Vita S, Castellano M (2018) Alginate and alginate/hyaluronic acid membranes generated by electrospinning in wet conditions: Relationship between solution viscosity and spinnability. *J Appl Polym Sci* **135**, 46390

Wang Y, Guo Z, Qian Y, Zhang Z, Lyu L, Wang Y, Ye F (2019) Study on the Electrospinning of Gelatin/Pullulan Composite Nanofibres. *Polymers* **11**, 1424.

Wen P, Zong MH, Linhardt RJ, Feng K, Wu H (2017) Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends Food Sci Technol* **70**, 56-68.

Wu L, Georgiev MI, Cao H, Nahar L, El-Seedi HR, Sarker SD, Xiao J, Lu B (2020) Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Med Res Rev* **40**, 2605-2649

Yao ZC, Chang MW, Ahmad Z, Li JS (2016) Encapsulation of rose hip seed oil into fibrous zein films for ambient and on demand food preservation via coaxial electrospinning. *J Food Eng* **191** <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.012>.

Zhang D, Chen L, Cai J, Dong Q, Din Z, Hu ZZ i sur. (2021) Starch/tea polyphenols

nanofibrous films for food packaging application: From facile construction to enhance mechanical, antioxidant and hydrophobic properties. *Food Chem* **360**, 129922. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129922>

Zlatić NM, Stanković MS, Simić ZS (2017) Secondary metabolites and metal content dynamics in *Teucrium montanum* L. and *Teucrium chamaedrys* L. from habitats with serpentine and calcareous substrate. *Environ Monit Assess* **189**, 110.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Vlastoručni potpis