

Formuliranje inkapsuliranih dozirnih sustava ekstrakata dobričice (*Glechoma hederacea* L.) sušenjem raspršivanjem

Žepić, Ivana

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:159:057874>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023

Ivana Žepić

**FORMULIRANJE
INKAPSULIRANIH DOZIRNIH
SUSTAVA EKSTRAKTA
DOBRIČICE (*Glechoma hederacea*
L.) SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM**

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 asistentice Danijele Šeremet, mag. ing.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta „*Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda*“ (IP-2019-04-5879) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes na vodstvu, ljubaznosti i susretljivosti prilikom izrade ovog rada, ali još se više zahvaljujem na svakoj toploj riječi, ohrabrenju i savjetima.

Ogromno hvala i asistentici Danijeli Šeremet na strpljivosti, trudu, razumijevanju i svim savjetima prilikom izrade ovog rada.

Hvala mojim prijateljicama, Ivoni i Nikolini, što su uvijek bile uz mene, vjerovala u mene i slavile svaki moj uspjeh kao da je njihov.

Hvala mojoj seki Ines, na svakoj pomoći, savjetu i ohrabrenju. Najviše od svega hvala na ljubavi i podršci.

Hvala mama, hvala tata, hvala vam za sve! Beskrajno hvala na bezuvjetnoj ljubavi i podršci i na svemu što činite za mene. Vama sve dugujem!

Hvala mom Zvonimiru, mojoj najvećoj podršci, mom vjetru u leđa i najvećoj motivaciji. Hvala što si uvijek vjerovao u mene, ohrabrivao me i bio mi podrška.

Bogu hvala!

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

FORMULIRANJE INKAPSULIRANIH DOZIRNIH SUSTAVA EKSTRAKATA DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Ivana Žepić, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058213275

Sažetak: Cilj ovoga rada bio je formulirati inkapsulirane dozirne sustave polifenolnog ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.) tehnikom sušenja raspršivanjem, uz primjenu različitih nosača. Pripremljeno je šest dozirnih sustava ekstrakta dobričice, pri čemu je u jednom kao nosač bila djelomično hidrolizirana guar guma, dok je u preostalih pet uzoraka 25 % djelomično hidrolizirane guar gume zamijenjeno slijedećim polimerima: hidrolizirani kolagen, karboksimetil celuloza, nutrioza, mucin i ksilan. Formuliranim inkapsulatima određena su fizikalna i bioaktivna svojstva. Najveća inkapsulacijska učinkovitost za najdominantniji polifenolni spoj dobričice, ružmarinsku kiselinu, određena je u sustavu s djelomično hidroliziranom guar gumom i mucinom (94,64 %). Najbolja kinetika otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina u simuliranim uvjetima probavnog sustava određena je u uzorku s hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom. Razvijene su nove formulacije čokolada obogaćenih s inkapsulatima djelomično hidrolizirane guar gume i karboksimetil celuloze i djelomično hidrolizirane guar gume i ksilana te liofiliziranim ekstraktom.

Ključne riječi: djelomično hidrolizirana guar guma, dobričica, inkapsulacija, sušenje raspršivanjem

Rad sadrži: 49 stranica, 17 slika, 5 tablica, 83 literaturnih navoda, 00 priloga

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: Danijela Šeremet, 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. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni (zamjenski član)

Datum obrane: 14. srpnja 2023

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

Formulation of encapsulated dosing systems of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) extract with spray drying

Ivana Žepić, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058213275

Abstract: The aim of this study was to formulate encapsulated dosage systems of the phenolic extract of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) using the spray drying technique, with the application of different carriers. Six dosage systems of ground ivy extract were prepared, where one of them used partially hydrolyzed guar gum as a carrier, while in the remaining five samples, 25% of partially hydrolyzed guar gum was replaced with the following polymers: hydrolyzed collagen, carboxymethyl cellulose, nutriose, mucin, and xylan. The formulated encapsulates were characterized for their physical and bioactive properties. The highest encapsulation efficiency for the most dominant polyphenolic compound of ground ivy, rosmarinic acid, was determined in the system with partially hydrolyzed guar gum and mucin (94.64 %). The best release kinetics of total polyphenols and hydroxycinnamic acids under simulated conditions of the digestive system were determined in the sample with hydrolyzed guar gum and carboxymethyl cellulose. New formulations of chocolates enriched with encapsulates of partially hydrolyzed guar gum and carboxymethyl cellulose, and partially hydrolyzed guar gum and xylan, as well as lyophilized extract, were developed.

Keywords: *encapsulation, ground ivy, partially hydrolyzed guar gum, spray drying*

Thesis contains: 49 pages, 17 figures, 5 tables, 83 references, 00 supplements

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: Danijela, Šeremet, MSc

Reviewers:

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

Thesis defended: July 14th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DOBRIČICA (<i>Glechoma hederacea</i> L.)	2
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI	3
2.3. INKAPSULACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA	7
2.4. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM	10
2.5. FUNKCIONALNA HRANA	13
2.5.1. Čokolada	14
2.5.2. Funkcionalni čokoladni proizvodi	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJAL	20
3.1.1. Uzorci	20
3.1.2. Kemikalije	20
3.1.3. Uređaji	21
3.2. METODE	22
3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva dobričice	22
3.2.2. Inkapsulacija polifenolnih spojeva dobričice sušenjem raspršivanjem	22
3.2.2.1. <i>Određivanje prinosa sušenjem raspršivanjem</i>	22
3.2.2.2. <i>Fizikalna karakterizacija inkapsulata</i>	23
<i>SEM analiza</i>	24
3.2.2.3. <i>Bioaktivna karakterizacija inkapsulata</i>	24
<i>Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti</i>	24
<i>In vitro digestija inkapsulata</i>	26
3.2.3. Priprema uzoraka čokolade s inkapsuliranim ekstraktima	26
3.2.3.1. <i>Bioaktivna karakterizacija čokolada</i>	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA INKAPSULATA	28
4.2. ODREĐIVANJE INKAPSULACIJSKE UČINKOVITOSTI	32
4.3. PROFIL OTPUŠTANJA UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA I HIDROKSICIMETNIH KISELINA INKAPSULATA	35
4.4. POLIFENOLNI SASTAV FUNKCIONALNIH ČOKOLADA	37
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1.UVOD

Nutritivno siromašna prehrana popraćena sjedilačkim načinom života doprinijela je sve većem širenju kroničnih bolesti, ali i jačanju svijesti potrošača o povezanosti prehrane i zdravlja. Stoga, suvremeni potrošači sve više traže hranu koja je obogaćena biološki aktivnim spojevima koji imaju potencijalno pozitivne zdravstvene učinke. Znanstvena istraživanja usmjerena su na proučavanja bioaktivnog sastava različitih biljnih vrsta, osobito njihovog polifenolnog sastava s ciljem formulacije funkcionalnih proizvoda.

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji, osim što su snažni antioksidansi, posjeduju antimikrobna, antikancerogena i protuupalna svojstva. Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) je ljekovita biljka koja se desetljećima primjenjuje u narodnoj medicini zbog bogatog polifenolnog sastava. Obzirom da su polifenolni spojevi osjetljivi na razne vanjske uvjete (prisutnost svjetla i kisika), kao i uvjete u probavnom sustavu te imaju nisku biodostupnost i gorak okus, razvijene su različite tehnike inkapsulacije koje prevazilaze navedene prepreke.

Inkapsulacija je postupak u kojem se biološki aktivni spojevi ugrađuju unutar ili prevlače kontinuiranim sustavom nosača kako bi se formirale čestice ili kapsule. Inkapsulacijske tehnike omogućuju produljen rok valjanosti proizvoda, maskiraju gorak okus bioaktivnih spojeva te ih štite od okolišnih uvjeta. Nadalje, inkapsulacijske tehnike omogućavaju kontrolirano i ciljano otpuštanje u organizmu. Sušenje raspršivanjem predstavlja jednu od najčešće korištenih inkapsulacijskih tehnika u prehrambenoj industriji. Proces je brz, jednostavan, odvija se kontinuirano te je pogodan za inkapsulaciju biološki aktivnih spojeva.

Cilj ovog rada bio je formulirati inkapsulirane dozirne sustave s polifenolnim ekstraktom dobičice (*Glechoma hederacea* L.) primjenom tehnike sušenja raspršivanjem. Inkapsuliranim dozirnima sustavima odredila se inkapsulacijska učinkovitost, udjel ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina. Sustavi su fizikalno okarakterizirani, a određen je i profil otpuštanja ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina u uvjetima simulirane probave (*in vitro* digestija). Cilj *in vitro* digestije bio je odabrati sustave s najboljom kinetikom otpuštanja te ih inkorporirati u čokoladu kako bi se formulirao funkcionalni prehrambeni proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DOBRIČICA (*Glechoma hederacea* L.)

Dobričica (slika 1) je ljekovita i aromatična biljka iz porodice usnača (*Laminaceae*). Carl Linne je prvi puta spomenuo dobričicu 1753. godine u knjizi *Species Plantarum*. Ime roda *Glechoma* dolazi od grčke riječi *glechon*= metvicu i *hederacea*=nalik na bršljan (Mitich, 1994). Stabljika je četverokutastog presjeka te raste isprepletano u tlo, a zbog karakterističnog oblika naziva se i puzava dobričica (Kumarasamy i sur., 2002). Listovi biljke su bubrežastog oblika s nazubljenim rubovima širine 0,5 – 4 cm. Boja listova mijenja se ovisno o staništu. Ukoliko biljka raste na zasjenjenom staništu listovi će biti tamnozeleno boje, dok će pocrveniti rastom na sunčanom staništu (Mitich, 1994). Cvjetovi su usnati, skupljeni po 3-4 u pršljenovima, najčešće ljubičaste ili tamnoplave boje (Anonymus 1). Dobričica cvate u periodu od travnja do kolovoza (Grić, 1990), a za rast je potrebno vlažno tlo bogato dušikom (Azimova i Glushenkova, 2012). Prirodno je rasprostranjena na staništima Europe i Azije, a obitava i na području Australije i Sjeverne Amerike. Raste uglavnom kolonijalno na travnjacima, livadama i listopadnim šumama. Na području Republike Hrvatske široko je rasprostranjena, izuzev primorskog područja s mediteranskom florom (Nikolić i Rešetnik, 2007).



Slika 1. Dobričica (Anonymus 2)

Dobričica se stoljećima upotrebljava kao sastojak ljekovitih pripravaka u tradicionalnoj medicini, obzirom da nadzemni dio biljke posjeduje adstringentna, diuretička, kardiotonična i

stimulirajuća svojstva, a pokazala se djelotvornom u liječenju astme, dijabetesa, visokog krvnog tlaka, glavobolje i gripe (Kim i sur., 2011; Kumarasamy i sur., 2002). Prema dosadašnjim istraživanjima dobričica posjeduje izražena farmakološka svojstva. Kumarasamy i sur. (2002) istraživali su djelovanje ekstrakata dobričice na inhibiciju različitih vrsta bakterija pri čemu su metanolni ekstrakti inhibirali rast čak 14 bakterijskih vrsta. Protuupalno i antioksidacijsko djelovanje vodenog ekstrakta dobričice dokazano je u *in vitro* istraživanju kojeg su proveli Chou i sur. (2020). Vodeni ekstrakt dobričice spriječio je DNA oštećenje u RAW 264.7 makrofagima aktiviranim lipopolisaharidom (LPS). Također, dokazano je smanjenje LPS inducirano dušikovog oksida (NO), kao i malondialdehida (MDA), upotrebom vodenog ekstrakta, a zabilježene su povećane vrijednosti glutationa (GSH). Protuupalno djelovanje ekstrakta dobričice odvija se regulacijom ekspresije upalnih enzima poput iNOS, COX-2, HO-1, kao i upalnog citokina TNF- α . U *in vivo* istraživanju provedenom na modelima štakora s upalnim stanjem jetre, ekstrakt dobričice doveo je do smanjenja koncentracije upalnih markera poput NF- κ B, TNF- α , IL-1 β i IL-6 (Wang i sur., 2017). Antikancerogena svojstva vodenog ekstrakta dobričice dokazana su u sinergiji s cisplatinom na humanim staničnim linijama karcinoma bubrega (786-O). Vodeni ekstrakt i cisplatin inhibiraju proliferaciju 786-O stanica te uzrokuju apoptozu stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa (Chou i sur., 2020). U istraživanju Qiao i sur. (2012) također je ispitan antikancerogeni potencijal ekstrakta dobričice na stanice melanoma. Rezultati su pokazali inhibiciju sinteze melanina u B16 stanicama melanoma, uslijed inhibicije ekspresije gena za tirozinazu. Obzirom da nije dokazana citotoksičnost prema stanicama melanoma, nego depigmentacija, ekstrakt dobričice pokazuje potencijal za primjenu u prevenciji hiperpigmentacije.

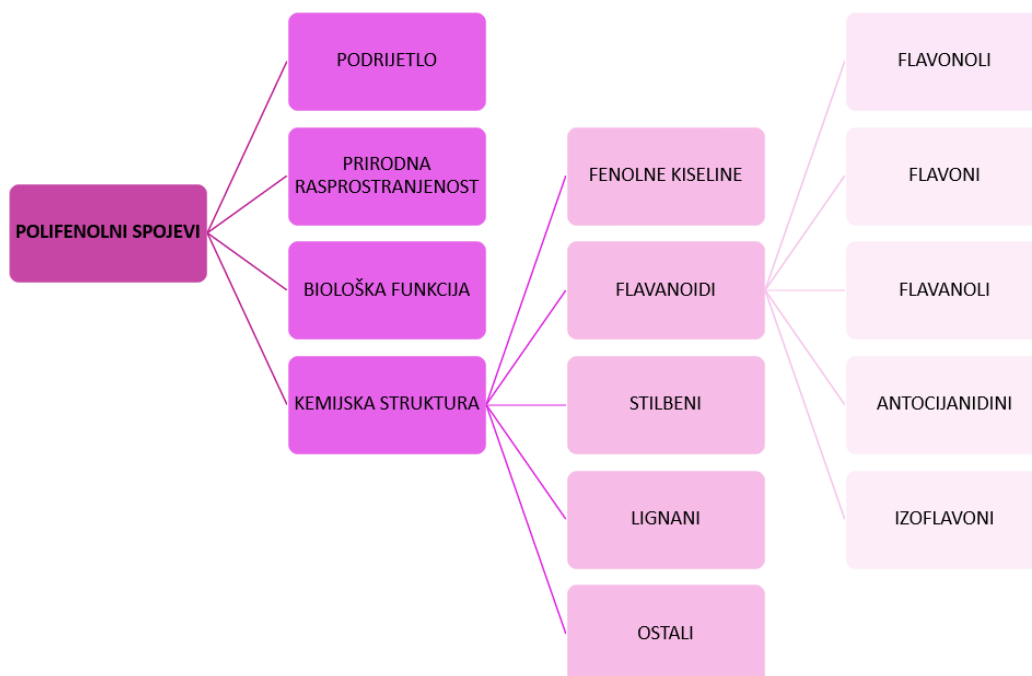
Navedeni zdravstveni učinci dobričice, ponajviše antioksidacijsko djelovanje, rezultat su brojnih biološki aktivnih spojeva, naročito polifenolnih spojeva.

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi predstavljaju jednu od najvećih i najrasprostranjenijih skupina sekundarnih biljnih metabolita. Primarna uloga polifenolnih spojeva je zaštita biljke od ultraljubičastog zračenja, patogena i insekata (D'Archivio i sur., 2007; Scalbert i Williamson, 2000). Više od 10 000 prirodno prisutnih spojeva ubraja se u polifenole. Polifenolni spojevi nalaze se u mnogim prehrambenim proizvodima poput voća, povrća, žitarica, mahunarki,

kave i čokolade (Manach i sur., 2018; D'Archivio i sur., 2007). Najvažnije svojstvo polifenola je sposobnost antioksidacijskog djelovanja uslijed oksidacijskog stresa u stanici. Iz tog razloga polifenolne spojeve često se naziva i antioksidansima. Zbog antioksidacijskog djelovanja polifenolni spojevi predstavljaju važnu ulogu u prevenciji i liječenju mnogih bolesti poput raka, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Scarlbet i sur., 2005).

Strukturno, svi polifenolni spojevi sastavljeni su od jednog ili više benzenskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina (Brglez Mojzer i sur., 2016; Bravo, 1998). Polifenolni spojevi sintetiziraju se iz dva biosintetska puta: šikimatnog i acetatnog. Klasificiraju se prema podrijetlu, biološkoj funkciji, rasprostranjenosti i kemijskoj strukturi (slika 2). Najčešća podjela je prema kemijskoj strukturi pri čemu su svrstani u 5 skupina: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, lignani i ostali (Bravo, 1998). Obzirom na lokaciju unutar biljke, polifenolni spojevi identificiraju se u slobodnom obliku, topljivoj frakciji stanice (tanini) ili vezani na strukture stanične stijenke (proteine, polisaharide) tvoreći stabilne netopljive komplekse (fenolne kiseline, kondenzirani tanini) (Shahidi i Yeo, 2016). Većinom su prisutni u glikoziliranom obliku s jednim ili više šećernih ostataka konjugiranih na hidroksilnu skupinu ili aromatski prsten, a iznimku predstavljaju flavanoli (Brglez Mojzer i sur., 2016).

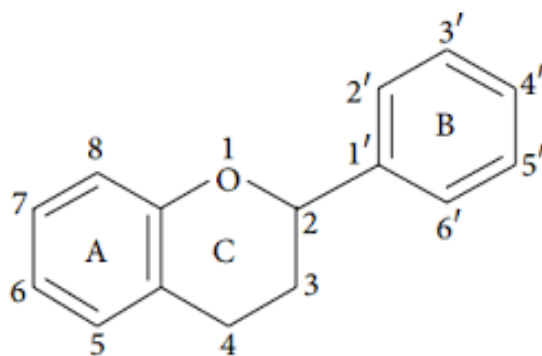


Slika 2. Podjela polifenolnih spojeva (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004)

Fenolne kiseline predstavljaju trećinu polifenolnih spojeva prisutnih u ljudskoj prehrani. Karakterizira ih benzenski prsten, karboksilna skupina te jedna ili više hidroksilnih ili metoksilnih skupina. Odlikuje ih visoka antioksidacijska aktivnost, koja je izravno povezana s brojem hidroksilnih skupina u molekuli. Fenolne kiseline dijele se na derivate hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline (Yang i sur., 2001).

Hidroksibenzojeve kiseline sastoje se od 7 ugljikovih atoma (C_6-C_1) i smatraju se najjednostavnijim fenolnim kiselinama u prirodi. Nalaze se u slobodnom ili vezanom (esterificiranom) obliku. Galna, elaginska, protokatehinska i 4-hidroksibenzojeva najčešći su predstavnici hidroksibenzojevih kiselina (D'Archivio i sur., 2007). Obzirom na mali udio hidroksibenzojevih kiselina u jestivim biljkama, one nisu od velikog značaja u ljudskoj prehrani, uz iznimku čaja koji obiluje galnom kiselinom ($4,5 \text{ g kg}^{-1}$) i crvenog bobičastog voća (270 mg kg^{-1}) (Tomas-Barberan i Clifford, 2000; Shahidi i Naczk, 1995). Hidroksicimetne kiseline sastoje se od 9 ugljikovih atoma (C_6-C_3) te su za razliku od hidroksibenzojevih kiselina vrlo česte u prirodi. Glavni predstavnici hidroksicimetnih kiselina su: kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Hidroksicimetne kiseline rijetko se nalaze u slobodnom obliku, osim u hrani procesiranoj postupcima fermentacije, sterilizacije ili zamrzavanja (Manach i sur., 2018). U hrani su zastupljene u obliku estera s kininskom kiselinom i glikozida s glukozom. Najzastupljenije fenolne kiseline u hrani su kafeinska i klorogenska kiselina. Kafeinska kiselina predstavlja 75-100 % ukupnih hidroksicimetnih kiselina u voću. Klorogenska kiselina (ester kafeinske i kininske kiseline) u visokim koncentracijama nalazi se u kavi ($0,35-1,75 \text{ mg mL}^{-1}$).

Flavonoidi pripadaju najvećoj skupini polifenolnih spojeva, ujedno i najzastupljenijoj u ljudskoj prehrani. Dijele strukturu difenil propana ($C_6-C_3-C_6$) sastavljenu od dva benzenska prstena povezana linernim lancem od tri ugljikova atoma. Središnji ugljikov lanac može formirati piranski prsten s jednim od benzenskih prstena. Na slici 3 prikazana je osnovna struktura flavanoida. Ovisno o stupnju oksidacije piranskog prstena flavanoidi se dijele u 6 podskupina: flavonoli, flavoni, flavanoni, izoflavoni, antocijanidini i flavanoli (katehini i proantocijanidini) (D'Archivio i sur., 2007). Razlikuju se po stupnju hidroksilacije te prisustvu dvostruke veze C_2-C_3 u heterocikličkom prstenu (Sánchez-Moreno, 2002). Flavonoli su najviše zastupljeni u hrani, a glavni predstavnici su kempferol i kvercetin. Nalaze se u glikoziliranom obliku, najčešće povezani s glukozom ili ramnozom. Flavonoli se u biljkama nalaze u nadzemnom dijelu, odnosno u listovima i stabljici obzirom da je za biosintezu neophodna svjetlost (Manach i sur., 2018).



Slika 3. Osnovna struktura flavanoida (D'Archivio i sur., 2007)

Stilbeni su najmanje zastupljeni polifenolni spojevi u ljudskoj prehrani. Prisutni su uglavnom u glikoziliranom obliku (Manach i sur., 2018). Glavni predstavnik ove skupine spojeva je resveratrol, koji se u visokim koncentracijama nalazi u koži crvenog grožđa ($50-100 \text{ g kg}^{-1}$) (Baliga i sur., 2005). Osim u grožđu, resveratrol se nalazi i u kikirikiju i bobičastom voću. Resveratrol se proizvodi u biljkama kao odgovor na različite stresore ili patogene infekcije (Delmas i sur., 2006; Bavaresco i sur., 2003). Zbog snažnog antioksidacijskog djelovanja resveratrol je dokazani antikancerogeni agens (Bhat i Pezzuto, 2002).

Lignani su strukturno sastavljeni od dvije fenilpropanske jedinice. Nalaze se većinski u slobodnom obliku u prirodi. Udio lignana u voću, povrću i žitaricama nalazi se u tragovima, osim u lanenim sjemenkama. Lanene sjemenke najbogatije su lignanima, sadrže $3,7 \text{ g kg}^{-1}$ sekoizolaricirezinola i male količine matarezinola (Manach i sur., 2018; D'Archivio i sur., 2007). Postoje istraživanja koja ukazuju na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti konzumacijom hrane bogate lignanima (Rodriguez-Garcia i sur., 2019).

2.2.1. Biološki aktivni spojevi dobričice

Polifenolni spojevi dobričice su zaslužni za njena izražena ljekovita svojstva. Fenolne kiseline i flavonoidi ističu se kao najzastupljenije skupine polifenolnih spojeva u dobričici. Među fenolnim kiselinama identificirane su klorogenska, kafeinska, ferulinska i ružmarinska kiselina. Ružmarinska i klorogenska kiselina zastupljene su u višim udjelima od ostalih fenolnih kiselina što je karakteristično za biljne vrste porodice *Laminaceae* (Döring i Petersen, 2014). Rutin i kvercetin predstavnici su flavonoida identificiranih u dobričici, a identificiran je i izoflavonoid genistein (Wang i sur., 2017).

Osim polifenolnih spojeva, u sastavu dobričice pronađeni su triterpenoidi – ursolična kiselina i oleanska kiselina (Kim i sur., 2011) te alkaloidi hederacin A i hederacin B (Sarker i sur., 2003). Kumarasamy i sur. (2006) dokazali su citotoksično djelovanje hederacina A i hederacina B na stanice raka debelog crijeva Caco-2. U listovima se nalaze polinezasićene masne kiseline (Kuhn i sur., 1989) te vrsta insekticidalnog lektina naziva gleheda (Singh i sur., 2006). Također, Kim i sur. (2011) izolirali su tri seskviterpenska laktona kojima je dokazano citotoksično djelovanje na humane stanične linije raka dojke, debelog crijeva i prostate.

2.3. INKAPSULACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA

Unatoč pozitivnom djelovanju na zdravlje, inkorporacija biološki aktivnih spojeva u hranu, predstavlja izazov za prehrambenu industriju. Biološki aktivni spojevi kemijski su nestabilni te su podložni razgradnji pod utjecajem kisika, topline, vlage i niskih pH vrijednosti. Osim toga, biološki aktivni spojevi imaju izrazito gorak okus kojeg je potrebno „zamaskirati“ prije inkorporacije u prehrambene proizvode. Primjena biološki aktivnih spojeva u izvornom obliku ograničena je zbog niske bioraspoloživosti, niske topljivosti i brzog otpuštanja u želucu (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Upotrebom inkapsulacijskih tehnika omogućeno je očuvati strukturu polifenolnih spojeva, „maskirati“ okus gorčine te kontrolirati otpuštanje u probavnom sustavu (Risch, 1995). Inkapsulacija se definira kao postupak u kojem se aktivne tvari ugrađuju unutar ili prevlače kontinuiranim sustavom nosača kako bi se formirale čestice ili kapsule (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020; Gibbs i sur., 1999). Tvar koja se inkapsulira naziva se i jezgra, ispun ili unutarnja faza, dok se materijal za inkapsulaciju naziva membrana, kapsula ili vanjska faza. Aktivna tvar najčešće je u tekućem obliku, iako može biti i čvrsta ili plinovita (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Metode inkapsulacije mogu se klasificirati u 4 skupine :

- fizikalne metode: sušenje raspršivanjem, inkapsulacija primjenom superkritičnih fluida
- fizikalno-kemijske metode: emulzifikacija, metoda uklanjanja otapala, ionsko geliranje
- kemijske: *in situ* polimerizacija, granična kristalizacija
- ostale metode: inkapsulacija u stanicama kvasaca, kokristalizacija, molekularna inkluzija.

Ovisno o odabiru tehnike inkapsulacije, dobivaju se čestice različite veličine koje se klasificiraju kao mikrokapsule (0,2-5000 μm) i nanokapsule ($< 0,2 \mu\text{m}$) (Abd El Kader i Abu

Hashish, 2020). Polifenolni spojevi inkapsuliraju se različitim tehnikama mikroinkapsulacije poput sušenja raspršivanjem, elektroispredanja, inkapsulacije liposomima i emulzifikacije. U tablici 1. prikazani su primjeri različitih tehnika inkapsulacije biološki aktivnih spojeva.

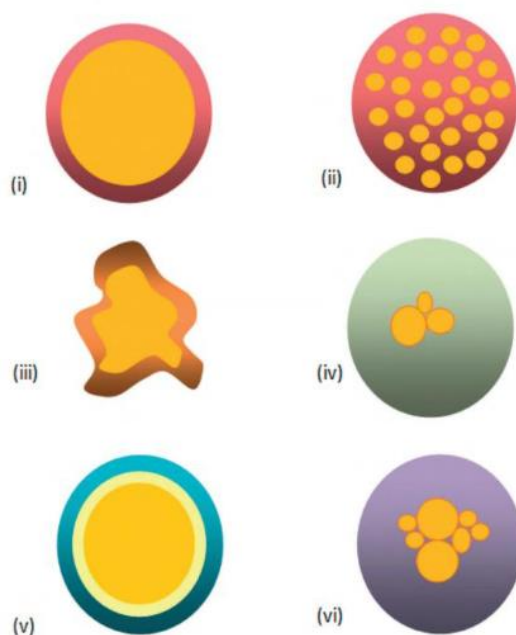
Tablica 1. Primjeri tehnika inkapsulacije za inkapsulaciju biološki aktivnih spojeva

TEHNIKA INKAPSULACIJE	IZVOR POLIFENOLNIH SPOJEVA	POLIFENOLNI SPOJEVI	REFERENCA
Ionsko geliranje	Zeleni čaj (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Cutrim, Alvim i Cortez, 2019)
	Stevija (<i>Stevia rebaudiana</i> L.)	Flavonoidi	(Arriola i sur., 2019)
	Artičoka (<i>Cynara scolymus</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Quispe Solano i sur., 2023)
Inkapsulacija liposomima	List goji bobica (<i>Lycium barbarum</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Pāvāloiu i sur., 2021)
	Hibiskus (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Antocijani	(Gibis, Zeeb i Weiss, 2014)
	List goji bobica (<i>Lycium barbarum</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Pāvāloiu i sur., 2021)
Elektroispredanje	Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i> L.)	Antocijani, flavonoidi	(Urena Arborio i sur., 2020)
	Grejp (<i>Citrus paradisi</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Han i sur., 2014)
	Zeleni čaj (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Shao, Niu, Chen i Sun, 2018)
Emulzifikacija	Crna bazga (<i>Sambucus nigra</i> L.)	Antocijani, flavonoli	(Marisa Ribeiro, Estevinho i Rocha, 2020)
	Rogač (<i>Ceratonia siliqua</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Wang i sur., 2020)
	Ružmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Bušić i sur., 2018)

Tablica 1. Primjeri tehnika inkapsulacije za inkapsulaciju biološki aktivnih spojeva -
nastavak

Sušenje raspršivanjem	Borovnica (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Flores, Singh i Kong, 2014)
	Crveni radič (<i>Chicorium intibus</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Zanoni i sur., 2020)
	Crni ribiz (<i>Ribes nigrum</i> L.)	Ukupni polifenoli	(Hosking, Grace, Xiong i Lila, 2023)

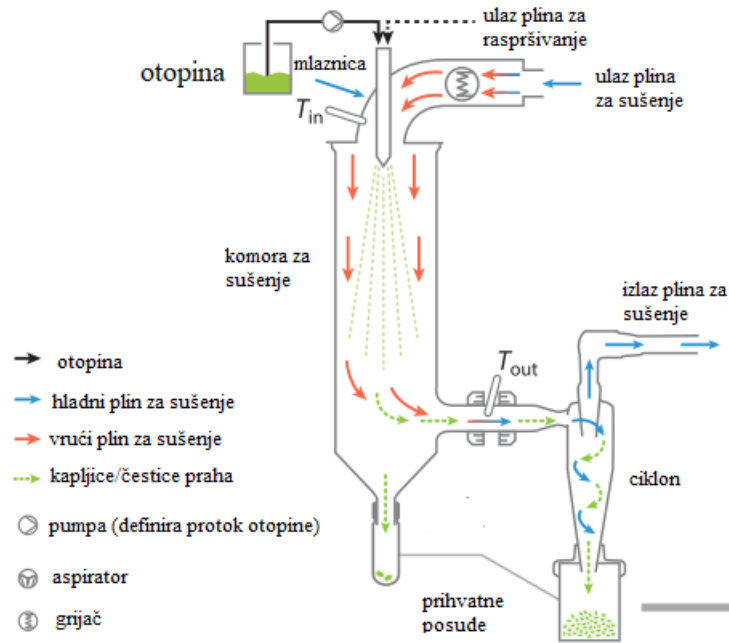
Strukture mikrokapsula mogu biti monojezgrene, višejezgrene i matrične (slika 4). U matričnoj strukturi biološki aktivni spoj raspršen je u obliku kapljica unutar nosača. Funkcionalna svojstva mikrokapsula, stabilnost i kontrolirano otpuštanje uvelike ovise o odabiru nosača, stoga je važno izabrati prikladan materijal za inkapsulaciju (Ye, Georges i Selomulya, 2018). Nosači za inkapsulaciju najčešće su ugljikohidrati, proteini, lipidi, gume te prirodni ili sintetski polimeri (Fang, 2010). Zbog zdravstvenih razloga materijali za inkapsulaciju moraju imati GRAS (engl. *Generally Recognized as Safe*) status. Kako bi se osigurala visoka inkapsulacijska učinkovitost potrebno je poznavati molekularnu strukturu nosača (molekulska masa i električni naboj), fizikalna svojstva (temperatura vrenja i temperatura taljenja), topljivost i kemijsku stabilnost, ali i biološka i kemijska svojstva aktivne tvari koja se inkapsulira. Prema Ye i sur. (2018) postoje 4 mehanizma tvorbe strukture matrice na temelju vrste inkapsulacijskog materijala. Polimerni nosači poput pektina, dekstrana i agara povezuju se kovalentnim vezama i umrežavaju se u hidrogel strukturu, lipidi se stabiliziraju van der Waalsovima i hidrofobnim interakcijama, dok se proteini umrežavaju tvoreći disulfidne veze i hidrofobne interakcije. Metalni alkoksidi i silicijev dioksid formiraju guste matrice hidrolizom i polikondenzacijom (Ye i sur., 2018).



Slika 4. Različite strukture mikroapsula: (i) – jednojezgrena, (ii) – matriks, (iii) – nepravilna, (iv) – višejezgrena, (v) – mikroapsula s višeslojnim nosačem, (vi) – složena mikroapsula (Onsaard i Onsaard, 2019)

2.4. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem predstavlja jednu od najčešće korištenih inkapsulacijskih tehnika u prehrambenoj industriji. Proces sušenja raspršivanjem definira se kao simultani proces atomizacije i dehidratacije otopine u prisutnosti vrućeg medija za sušenje pri čemu dolazi do isparavanja vlage, što u konačnici rezultira praškastim materijalom (Padma Ishwarya i Anandharamakrishnan, 2017). Također, ova tehnika pokazala se izvrsnom za inkapsulaciju biološki aktivnih spojeva. Inkapsuliranim biološki aktivnim spojevima produžena je stabilnost, očuvana su antioksidacijska svojstva te je prikriven okus gorčine (Furuta i Neoh, 2021). Shematski prikaz uređaja namijenjenog za sušenje raspršivanjem prikazan je na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem (Assadpour i Jafari, 2019)

Postupak sušenja raspršivanjem provodi se u 3 faze: atomizacija, sušenje, odvajanje i prikupljanje. Tekućina se pomoću peristaltičke pumpe dovodi do atomizera koji može biti centrifugalni ili jedno/dvofluidna mlaznica. U atomizeru se tekućina raspršuje u sitne kapljice pri čemu se smanjuje površinska napetost. Uslijed stvaranja velikog broja malih kapljica dolazi do povećanja površine čestica, čime je omogućen optimalan prijenos mase i topline između zagrijanog plina za sušenje i kapljica (Santos i sur., 2018). Nakon procesa atomizacije, slijedi faza formiranja čestica, ujedno i glavna faza procesa sušenja raspršivanjem. U ovoj fazi dva su ključna koraka: kontakt raspršenih čestica sa zrakom te sušenje čestica. Atomizirane kapljice izlažu se vrućem plinu unutar komore za sušenje pri čemu dolazi do isparavanja vlage. Plin koji se koristi za sušenje, uobičajeno je zagrijani i filtrirani atmosferski zrak, ali ponekad se koriste inertni plinovi poput dušika kako bi se izbjegle moguće interakcije između plina i kapljica. Kontaktom kapljica s plinom unutar komore za sušenje dolazi do isparavanja i kondenzacije otopljene tvari što rezultira uklanjanjem otapala. Ovaj fenomen prikazuje problem ravnoteže mase i topline uzrokovan razlikom tlaka pare otapala i parcijalnog tlaka pare otapala u odnosu na plinsku fazu. Dakle, temperatura vrućeg plina pokreće izmjenu topline s plina na kapljice, a razlika tlaka pare uzrokuje prijenos vlage u suprotnom smjeru što rezultira osušenim česticama prahe (Vehring, Foss i Lechuga-Ballesteros, 2007). Završetkom procesa pretvorbe kapljica u čestice, potrebno je odvojiti i prikupiti osušene čestice. Odvajanje osušenih čestica odvija se kroz dvije faze

separacije – primarna i sekundarna. U primarnoj separaciji najgušće čestice se talože i skupljaju na koničnom dnu komore za sušenje (Padma Ishwarya i Anandharamkrishnan, 2017). U fazi sekundarne separacije najfinije i najmanje čestice odvođe se do ciklonskih separatora, gdje se odvajaju od vlažnog zraka (Santos i sur., 2018).

Svojstva otopine, izbor nosača i uvjeti sušenja determinirajući su parametri za konačna svojstva praha i postizanje visoke inkapsulacijske učinkovitosti. Stoga je ključno optimirati navedene parametre prije samog procesa sušenja raspršivanjem (Rezvankhah, Emam-djomeh i Askari, 2019). Viskoznost i površinska napetost ključna su svojstva otopine koja utječu na proces inkapsulacije sušenjem raspršivanjem (Würth, Foerst i Kulozik, 2018). Većina aktivnih tvari za inkapsulaciju su biološki aktivne tvari ekstrahirane iz živih organizama - biljaka, bakterija i riba. Mnoge biološki aktivne tvari su hidrofobne te se ne mogu pravilno i homogeno dispergirati u otopini bez razdvajanja faza. Emulzifikacijom aktivne tvari, odnosno dodatkom emulgatora u otopinu, postiže se kinetička stabilnost kapljica smanjenjem površinske napetosti na granici ulje/voda pri čemu se kapljice homogeno dispergiraju u otopini (Furuta i Neoh, 2021). Izbor nosača određuje se prema fizikalno-kemijskim karakteristikama aktivne tvari te svrsi inkapsulacije. Osim što moraju biti odobreni od strane regulatornih tijela i sigurni za ljudsku upotrebu, nosači moraju zadovoljiti 3 kriterija: izvrsno stvaranje zaštitne barijere, visoka topljivost u vodi i dobra sposobnost stvaranja omotača. Najčešće korišteni nosači u procesu sušenja raspršivanjem su polimeri ugljikohidrata poput maltodekstrina, modificiranog škroba, karboksimetilceluloze i kitozana (Furuta i Neoh, 2021). Relativna vlažnost i ulazna temperatura ulaznog plina čimbenici su koji određuju brzinu sušenja praha te konačni udio vode. Visoka ulazna temperatura osigurava postizanje najnižeg udjela vode te sprječava aglomeraciju čestica i degradaciju biološki aktivnih spojeva. Također, povećanjem ulazne temperature povećava se i veličina čestica što rezultira većim prinosom (Piñón-Balderrama i sur., 2020). Raspon ulaznih temperatura u procesu sušenja raspršivanjem varira od 140 °C do 200 °C.

Prema Assadpour i Jafari (2019) neke od glavnih prednosti procesa sušenja raspršivanjem su:

- kontrola veličine, oblika i morfologije čestica
- jednostavnost procesa
- niski troškovi opreme, brzina procesa
- viska inkapsulacijska učinkovitost i produljen rok valjanosti prahova
- primjenjivo na hidrofobne i hidrofilne sastojke hrane

- tvorba čestica s kontroliranim otpuštanjem.

2.5. FUNKCIONALNA HRANA

Ubrzani način života popraćen nutritivno siromašnom (pre)hranom i slabom fizičkom aktivnošću doveo je do sve većeg širenja i razvoja kroničnih bolesti (Plasek, Kasza i Temesi, 2020). Funkcionalna hrana razvijena je u svrhu poboljšanja zdravstvenog stanja populacije te smanjenja rizika od kroničnih bolesti (Baker, Lu, Parella i Legette, 2022). Pojam funkcionalna hrana prvi se put pojavila u Japanu 1984. godine. U Japanu funkcionalna hrana ima priznatu pravnu kategoriju hrane pod nazivom FOSHU (engl. *Foods for Specific Health Uses*). Da bi se kvalificirala kao takva, hrana mora ispunjavati tri zahtjeva: dokazana učinkovitost u kliničkim studijama, sigurnost potvrđena kroz kliničke i nekliničke studije i identifikacija aktivnih/učinkovitih spojeva (Martirosyan i Singh, 2015). Za razliku od Japana, Europska Unija nema definiranu zakonsku legislativu vezanu uz funkcionalnu hranu, ali postoje određeni kriteriji prema kojima se hrana može deklarirati kao funkcionalna. Prema definiciji Europske komisije hrana se smatra „funkcionalnom“ kada zadovoljava uvjete da dokazano unaprjeđuje jednu ili više ciljnih funkcija u tijelu, prema odgovarajućim prehrambenim učincima koji su relevantni za poboljšanje zdravstvenog stanja i dobrobiti te smanjenje rizika od bolesti (Diplock i sur., 1999). Unutar Europske Unije, proizvođačima hrane dopušteno je iznositi dvije vrste tvrdnji – nutritivnu i/ili zdravstvenu tvrdnju. Nutritivna tvrdnja podrazumijeva osnovnu hranjivu i energetska vrijednost namirnice, dok se zdravstvene tvrdnje odnose na sposobnost namirnice da prevenira, kontrolira i liječi bolest. Ukoliko se hrana deklarira zdravstvenom tvrdnjom mora biti potkrijepljena znanstvenim dokazima i zadovoljiti stroge kriterije. Četiri su koraka u postupku dobivanja zdravstvene tvrdnje: identifikacija aktivne komponente, provedba kliničkih studija i meta-analiza, izravno mjerenje zdravstvenih ishoda ili upotreba relevantnih biomarkera, statistička značajnost zdravstvenih dobiti (Martirosyan i Singh, 2015).

Funkcionalna hrana može biti prirodna hrana, hrana kojoj je dodana ili oduzeta neka komponenta, hrana u kojoj su neke komponente modificirane, hrana kojoj je modificirana bioraspoloživost ili bilo koja kombinacija navedenih postupaka. Nadalje, funkcionalna hrana može se kategorizirati u 3 skupine:

- Konvencionalna hrana – prirodno sadrži bioaktivne spojeve, obuhvaća voće, povrće, začinsko bilje

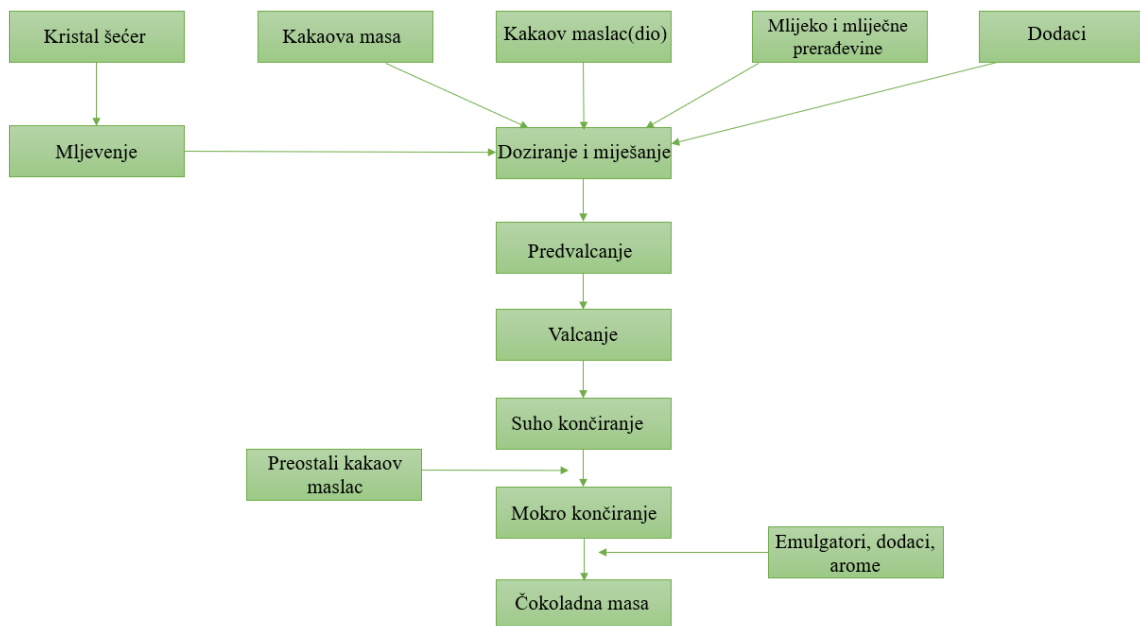
- Modificirana hrana – obogaćena bioaktivnim spojevima, poput jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama (Ye i sur., 2018)
- Sintetizirani sastojci hrane – poput posebnih ugljikohidrata koji imaju probiotički učinak (Henry, 2010).

Polifenolni spojevi, karotenoidi, vitamini, probiotici i prebiotici najčešće su korišteni prilikom proizvodnje funkcionalne hrane obzirom da imaju značajne benefite za ljudsko zdravlje (Jeđrusek-Golińska i sur., 2020). Međutim, zbog niske topljivosti i biodostupnosti te nepovoljnih uvjeta u probavnom sustavu, mali broj bioaktivnih spojeva ostaje raspoloživ nakon oralne primjene. Kako bi se prevladali ovi izazovi, učinkovito rješenje je primjena inkapsulacijskih tehnika koje rezultiraju nanočesticama ili mikročesticama koje sadrže bioaktivne spojeve ili esencijalne mineralne tvari (Granato i sur., 2020).

2.5.1. Čokolada

Prema Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima (Pravilnik, 2005) čokolada je proizvod dobiven od kakaovih proizvoda i šećera koji sadrži najmanje 35 % ukupne suhe tvari kakaovih dijelova, uključujući najmanje 18 % kakaovog maslaca i najmanje 14 % bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova. Čokolada predstavlja složen reološki sustav. Opisuje se kao suspenzija koja se sastoji od bezmasnih čestica (šećer, kakaovi dijelovi) raspršenih u kakaovom maslacu kao kontinuiranoj masnoj fazi (Zarić i sur., 2016). Primarna podjela čokolada je u 3 kategorije: tamna, mliječna i bijela čokolada. Razlikuju se ovisno o udjelu kakaovih dijelova, mliječne masti i kakaovog maslaca. Bijela čokolada razlikuje se od tamne po tome što ne sadrži kakaove dijelove, a u njima se nalaze biološki aktivni spojevi. Stoga bijela čokolada nema istaknutih zdravstvenih benefita za razliku od tamne te joj je smanjen i rok valjanosti (Afoakwa, 2016).

Izrada čokoladne mase obuhvaća nekoliko tehnoloških postupaka u kojima se svi sastojci miješaju kako bi se dobio homogeni proizvod (slika 6). Tehnološki procesi obuhvaćaju: pripremu zamjesa (šećer i kakaova masa), valcanje, končiranje, temperiranje i stavljanje u kalupe (Afoakwa, 2016).



Slika 6. Prikaz tehnoloških operacija u izradi čokoladne mase (Goldoni, 2004)

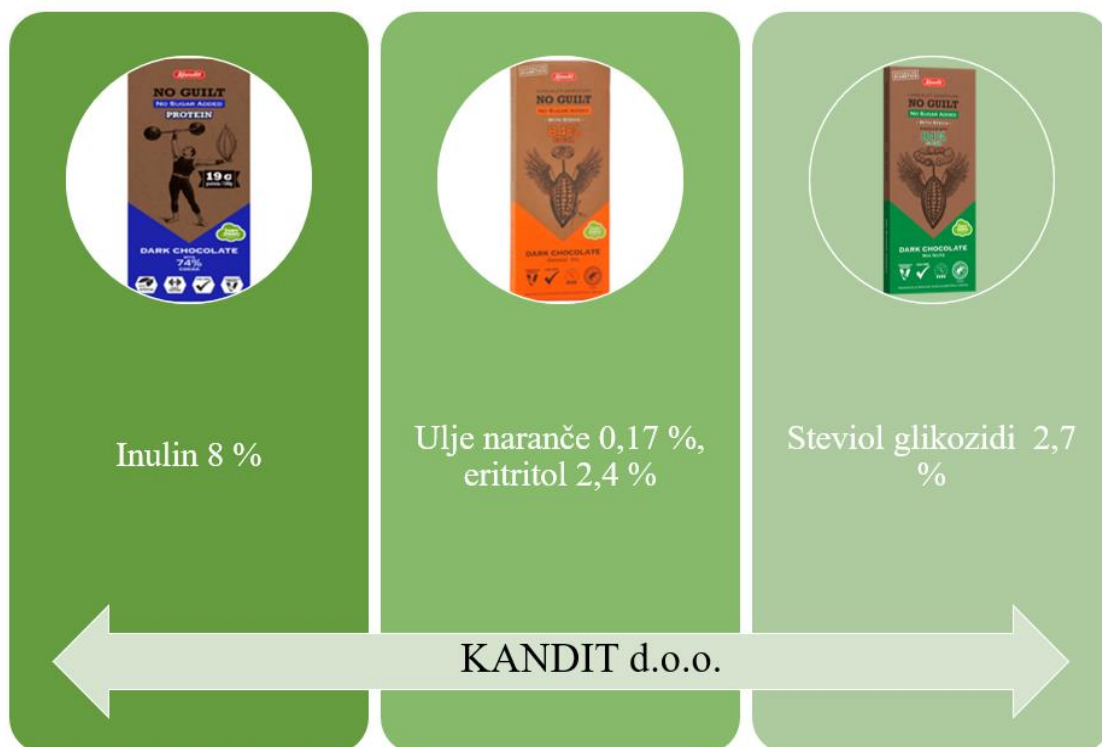
2.5.2. Funkcionalni čokoladni proizvodi

Čokolada s većim udjelom kakaovih dijelova predstavlja funkcionalan proizvod obzirom da sadrži visok udio flavonoida i ima potencijalno pozitivan učinak na zdravlje (Tolve i sur., 2018). Međutim, obzirom na eksponencijalni rast tržišta funkcionalne hrane, potrošači su pokazali interes i za čokoladama dodatno obogaćenima različitim funkcionalnim sastojcima. Tako se danas na tržištu mogu pronaći čokolade obogaćene polifenolnim ekstraktima, probioticima, prebioticima, mineralnim tvarima, alkaloidima, prehrambenim vlaknima, kao i čokolade bez ili smanjenog udjela šećera (Shahbazi i sur., 2022). Posebnu pažnju privlače čokolade obogaćene polifenolnim ekstraktima prirodnog podrijetla, bilo iz raznog voća ili ljekovitih biljaka. Budući da je većina polifenolnih spojeva nestabilna, sve je veća primjena inkapsulacijskih tehnika koje, osim maskiranja gorkog okusa polifenolnih spojeva, povećavaju stabilnost i omogućavaju kontrolirano otpuštanje u organizmu (Lončarević i sur., 2019). Tolve i sur. (2018) proizveli su tamne čokolade s 64, 72 i 85 % kakaovih dijelova obogaćenih mikrokapsulama fitosterola dobivenih tehnikom sušenja raspršivanjem. Čokolade su obogaćene s 5, 10 i 15 % mikroinkapsuliranih fitosterola te su podvrgnute kemijskoj i senzorskoj analizi. Rezultati istraživanja pokazali su da nema značajnog utjecaja između udjela kakaovih dijelova i dodatka mikrokapsula na senzorska

svojstva čokolade. Prijedlog je da se čokolada s 85 % kakaovih dijelova koristi za obogaćivanje kako bi se razvio funkcionalan proizvod značajnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Također, dokazana je statistički značajna korelacija između udjela kakaovih dijelova i koncentracije mikroinkapsuliranih fitosterola na antioksidacijsku sposobnost. Čokolada s 85 % kakaovih dijelova i 15 % mikroinkapsuliranih fitosterola pokazala je najvišu antioksidacijsku učinkovitost. Lončarević i sur. (2019) proizveli su bijelu čokoladu obogaćenu inkapsuliranim ekstraktom crnog čaja dobivenog sušenjem raspršivanjem. Bijela čokolada ne sadrži polifenolne spojeve, obzirom da u svom kemijskom sastavu nema kakaovih dijelova. Međutim, rezultati istraživanja pokazali su da se udio ukupnih polifenolnih spojeva u obogaćenoj čokoladi ($250,18 \pm 4,99$ mg GAE/100 g) povećao čak 6 puta u odnosu na običnu bijelu čokoladu ($40,75 \pm 0,96$ mg GAE/100 g). Lorenzo i sur. (2022) inkorporirali su liofiliziranu pulpu pequia (*Caryocar villosum*) u tamnu čokoladu u svrhu poboljšanja nutritivne vrijednosti. 1,5 % liofiliziranog ekstrakta dodanog u tamnu čokoladu ($813,49$ μ g GAE mL⁻¹) značajno je povisilo udjel ukupnih polifenola u odnosu na kontrolni uzorak bez liofiliziranog ekstrakta ($235,98$ μ g GAE mL⁻¹). Osim polifenolnih spojeva, u novije vrijeme inkapsuliraju se i probiotički sojevi u čokolade. Probiotici su živi organizmi koji kada se unesu u dovoljnoj količini pružaju zdravstvene dobrobiti. Međutim, probiotici moraju prevazići brojne prepreke poput temperature skladištenja, procesnih uvjeta te nepovoljnih uvjeta u probavnom sustavu. Hossain (2021) je formulirao čokolade s probiotičkim sojevima. Čokolade su formulirane liofilizacijom čak 7 probiotičkih kultura (*Lactobacillus acidophilus* (La5), *L. rhamnosus* (LGG), *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. casei* 431, *Bifidobacterium animalis* subspp. *lactis* (Bb12), *Streptococcus thermophilus*, *L. rhamnosus* (LGG), *B. animalis* subspp. *lactis* (Bb12), *L. casei*). Korišteni nosači bili su natrijev alginat s kakaovim prahom te smjesa natrijevog alginata, fruktooligosaharida i kakaovog praha. Najveća inkapsulacijska učinkovitost od 95,40 % i 95,36 % postignuta je u formulacijama s probiotičkim sojevima *Lactobacillus casei*, odnosno *Lactobacillus acidophilus* L5. Obogaćene čokolade sadržavale su veću količinu probiotika od preporučene terapeutske ($>10^7$ CFU g⁻¹) i u istraživanju je određeno značajno visoko preživljavanje inkapsuliranih probiotika tijekom *in vitro* digestije. Na slikama 7, 8, 9 i 10 prikazane su funkcionalne čokolade koje se mogu pronaći na hrvatskom tržištu.



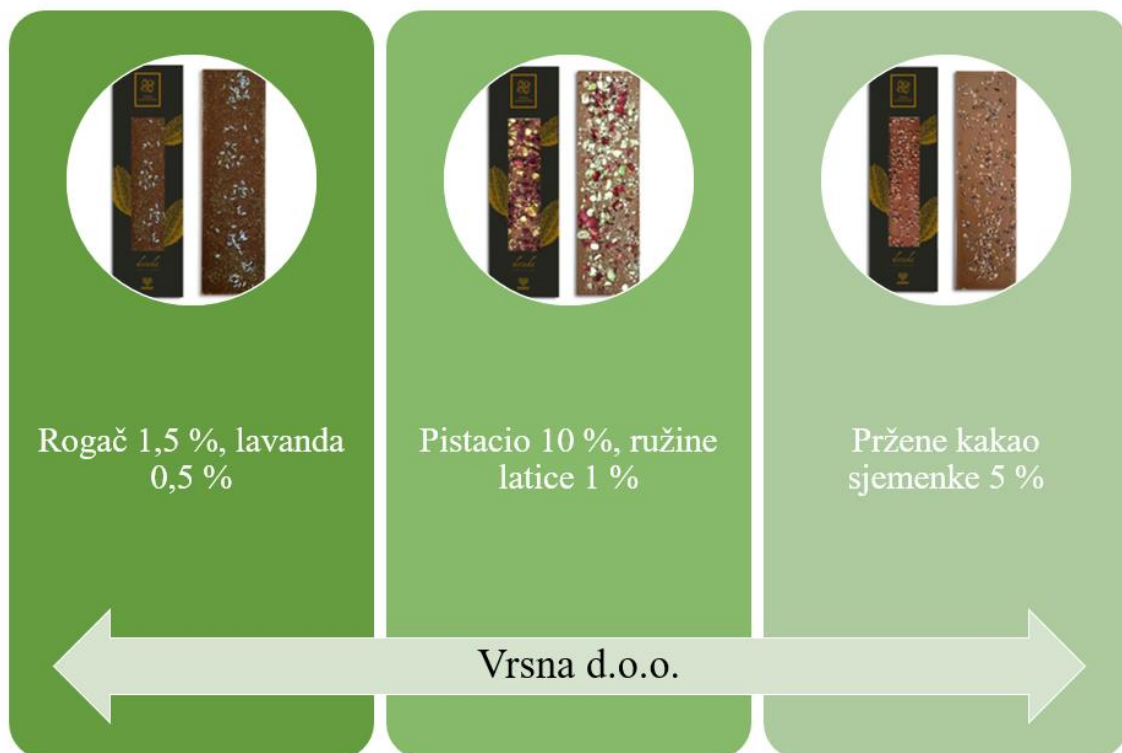
Slika 7. Funkcionalne čokolade kompanije Kraš d.d.



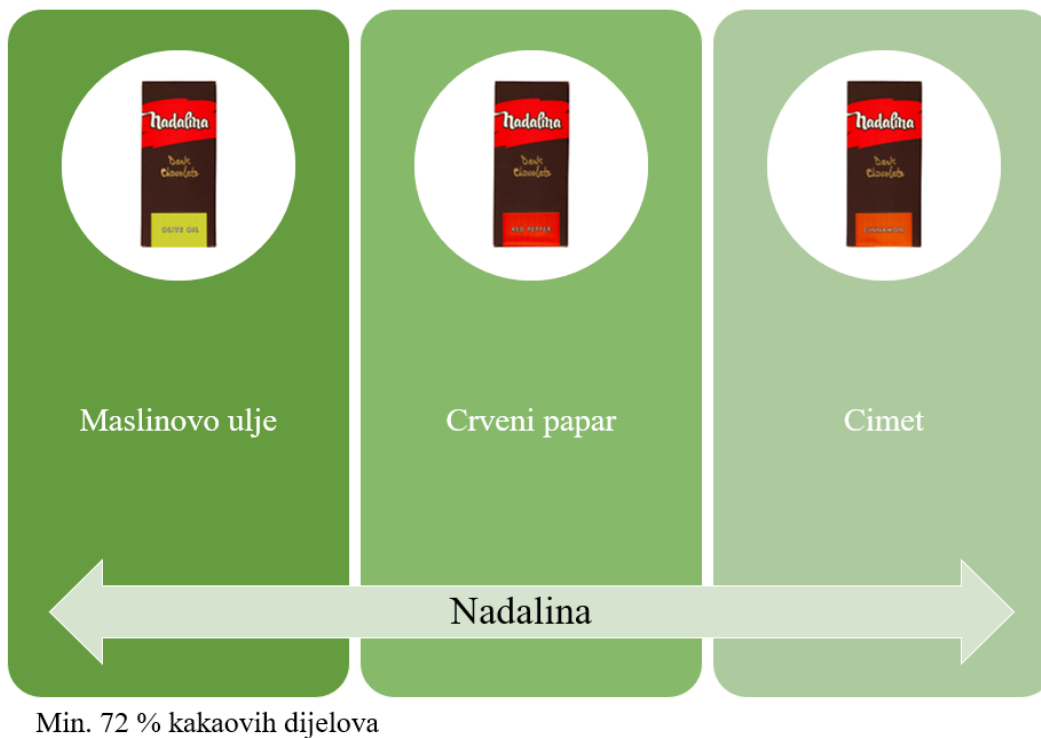
Slika 8. Funkcionalne čokolade kompanije Kandit d.o.o.



Slika 9. Funkcionalne čokolade kompanije Zvečevo d.d.



Slika 10. Funkcionalne čokolade manje kompanije Vrsna d.o.o.



Slika 11. Funkcionalne čokolade manje kompanije Nadalina



Slika 12. Funkcionalne čokolade manjih kompanija Hedona i Malo i slatko d.o.o.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog rada korišteni su osušeni nadzemni dijelovi biljke dobričice proizvođača Travar MB d.o.o. (Bjelovar, Hrvatska). Nadzemni dijelovi biljke usitnjeni su u električnom mlinu te se za daljnje eksperimente koristila frakcija veličine čestica < 450 μm.

Čokoladna masa korištena u ovome radu donacija je tvrtke Kraš d.d. (Zagreb, Hrvatska).

3.1.2. Kemikalije

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

- Acetonitril, Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Amonijev karbonat, Lach-Ner (Neratovice, Češka)
- Analitički standardi bioaktivnih spojeva:
 - ❖ Kafein, (HPLC standard), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Kafeinska kiselina (HPLC standard), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Klorogenska kiselina (95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Kriptoklorogenska kiselina (>98 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Rutin trihidrat (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
 - ❖ Ružmarinska kiselina (97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Teobromin (HPLC standard), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Djelomično hidrolizirana guar guma, Palco d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Hidrolizirani kolagen, Biosynth AG (Staad, Švicarska)
- Kalijev dihidrogen fosfat, Lach-Ner (Neratovice, Češka)
- Kalijev klorid, Lach-Ner (Neratovice, Češka)
- Karboksimetil celuloza, Biosynth AG (Staad, Švicarska)
- Klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Ksilan, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Njemačka)

- Magnezijev klorid heksahidrat, Lach-Ner (Neratovice, Češka)
- Metanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Pancreac (Barcelona, Španjolska)
- Mucin, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev hidrogen karbonat, Lach-Ner (Neratovice, Češka)
- Natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Carlo Erba (Emmendingen, Njemačka)
- Natrijev molibdat, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Natrijev nitrit, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Nutrioza, Roquette (Lestrem, Francuska)
- Pankreatin, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Pepsin, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Petroleter, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Žučne soli, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

3.1.3. Uređaji

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Büchi Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG (Flawil, Švicarska)
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (Suzhou, Kina)
- Električni mlin, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železnik, Slovenija)
- Magnetska mješalica (SMHS-6), Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- Mikropipete Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Rotacijski vakuum uparivač RV8, IKA (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- Spektrofotometar (GenesysTM 10S UV-VIS), Thermo Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od degazera, kvarterne pumpe, automatskog injektora, termostata i DAD (engl. *Diode-Array Detector*) detektora
- Ultrazvučna kupelj (S60H) Elmasonic Elma (Singen, Njemačka)

- Uređaj za temperiranje (Pomati T5), Pomati Group SRL, (Codogno, Italija)
- Vodena kupelj Inko VKZ ERN, Inkolab d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva dobričice

U reagens bocu odvaže se 1 g uzorka dobričice te se doda 100 mL destilirane vode. Ekstrakcija se provodi 10 minuta na 100 °C u vodenoj kupelji. Nakon ekstrakcije, ekstrakt se ohladi, filtrira te centrifugira (9500 rpm, 20 minuta, 4 °C). Supernatant se koncentrira na rotacijskom uparivaču do 10 puta manjeg volumena. Tako pripremljeni ekstrakt koristi se za pripremu otopina nosača za sušenje raspršivanjem.

3.2.2. Inkapsulacija polifenolnih spojeva dobričice sušenjem raspršivanjem

Otopine nosača za sušenje raspršivanjem pripremljene su otapanjem različitih polimera u prethodno pripremljene koncentrirane ekstrakte dobričice. Otopine su pripremljene tako da sadrže 4 % (w/w) polimera. Ukupno je pripremljeno 6 otopina. Kontrolna otopina sadržavala je 4 % (w/w) djelomično hidrolizirane guar gume, dok je u preostalih 5 otopina 25 % guar gume zamijenjeno s drugim polimerima: hidrolizirani kolagen, karboksimetil celuloza, nutrioza, mucin i ksilan.

Otopine nosača u ekstraktu dobričice podvrgnule su se procesu sušenja raspršivanjem korištenjem uređaja Büchi B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) s mlaznicom promjera 0,7 mm. Radni uvjeti uređaja postavljeni su kako slijedi: ulazna temperatura zraka 150 ± 2 °C, aspiracija 100 % i brzina protoka tekućine 2 mL min^{-1} . Uzorci su prikupljeni u čvrste staklene posude i čuvani na 4 °C do daljnjih analiza.

3.2.2.1. Određivanje prinosa sušenjem raspršivanjem

Prinos sušenja raspršivanjem izračuna se prema formuli :

$$P(\%) = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je :

m_1 – masa praha dobivenog sušenjem raspršivanjem (g)

m_2 – masa suhe tvari otopine nosača u ekstraktu (g)

3.2.2.2. Fizikalna karakterizacija inkapsulata

Određivanje udjela suhe tvari inkapsulata

Udjel suhe tvari određen je prema modificiranoj AOAC 930.15 metodi (Padmore, 1990) sušenjem uzoraka do konstante mase pri 105 °C. Odvaje se 0,5 g (s točnošću ± 0,02 g) homogeniziranog uzorka u prethodno osušene, ohlađene i izvagane aluminijske posudice s poklopcem. Nepokrivene posudice s uzorcima i poklopci suše se u sušioniku pri 105 °C do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja, aluminijske posudice s uzorcima prebace se u eksikator i važu čim se ohlade na sobnu temperaturu. Ostatak uzorka u posudici predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi udjel vode u uzorku. Udjel vode izračuna se prema formuli [2], dok se udjel suhe tvari izračuna kao razlika udjela vode od 100 % [3].

$$\text{Udjel vode (\%)} = (m_2 - m_3) / (m_2 - m_1) \cdot 100 \quad [2]$$

$$\text{Udjel suhe tvari (\%)} = 100 \% - \text{Udjel vode (\%)} \quad [3]$$

gdje su :

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

Određivanje nasipne gustoće inkapsulata

Uzorak se nasipa u menzuru ukupnog volumena 250 mL te izvaže. Nakon očitavanja početne mase i volumena, menzura s uzorkom se pričvršćuje na postolje vibracionog volumetra. Volumetar se pokreće uključivanjem sklopke te se promjena volumena očitava nakon 10, 100 i 1250 udaraca. Iz dobivenih podataka izračuna se nasipna gustoća uzoraka nakon 0 udaraca i nakon 1250 udaraca koja se koristi za izračunavanje svojstava tečenja prema Hausnerovom omjeru i Carrovom indeksu prema formulama [4] i [5].

$$\text{HR} = \frac{\rho_{\text{vibraciona}} (1250)}{\rho_{\text{slobodna}} (0)} \quad \text{Hausnerov omjer} \quad [4]$$

$$\text{I}_c = \frac{\rho_{\text{vibraciona}} (1250) - \rho_{\text{slobodna}} (0)}{\rho_{\text{slobodna}} (0)} \cdot 100 \quad \text{Carrov indeks} \quad [5]$$

Određivanje močivosti inkapsuliranih ekstrakata

Močivost prahova dobivenih sušenjem raspršivanjem provedena je prema radu Jinaponga i suradnika (2008) s određenim modifikacijama. U laboratorijsku čašu od 250 mL doda se 100 mL destilirane vode. Potom se 0,1 g praha doda u čašu. Močivost se mjeri kao vrijeme u sekundama koje je potrebno da sav prah postane mokar, odnosno, kada sve čestice praha prodru površinu vode.

Određivanje zeta potencijala inkapsuliranih ekstrakata

Zeta potencijal inkapsuliranih ekstrakata odredio se koristeći uređaj Malvern Zetasizer Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo). Inkapsulirani ekstrakti se prije mjerenja suspendiraju u metanolu (pH=6,8) i urone u ultrazvučnu kupelj na 15 sekundi. Zatim se prebace u odgovarajuće kivete (DTS1070; Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) i analiziraju.

SEM analiza

Morfološke karakteristike i veličina inkapsulata odredili su se skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) koristeći mikroskop TESCAN Mira3 (Brno, Češka). Uzorci se pričvrste na podlogu pomoću dvostrane ljepljive vrpce i oblože slojem zlata (5 nm) te se ispituju koristeći napon ubrzanja od 4,0 kV i uvećanje od 600 puta.

3.2.2.3. Bioaktivna karakterizacija inkapsulata

Određivanje inkapsulacijske učinkovitosti

Inkapsulacijska učinkovitost određena je za ukupne polifenole i hidrokscimetne kiseline koristeći spektrofotometrijske metode te za pojedinačne polifenolne spojeve koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC).

Inkapsulacijska učinkovitost određena je otapanjem 1 g inkapsulata u 5 mL destilirane vode na magnetskoj miješalici. Inkapsulacijska učinkovitost izračunata je kao omjer udjela istraživanih spojeva u „razbijenim“ česticama praha te u otopini nosača i ekstrakta.

Udjel ukupnih polifenola određen je koristeći modificiranu metodu Singleton i sur. (1999). U staklene epruvete otpipetira se 3,95 mL destilirane vode, 50 µL uzorka, 250 µL Folin Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 750 µL 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 u mraku 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 50 μL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Baždarna krivulja izrađena je koristeći standard galne kiseline.

Udjel hidroksicimetnih kiselina određen je koristeći metodu modificiranu prema Matkowski i suradnicima (2008). Reakcijska smjesa sastoji se od 500 μL uzorka, 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnov-og reagensa (10 % (w/v) otopina natrijevog nitrita i natrijevog molibdata), 1 mL 8,5 %-tne vodene otopine NaOH i 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se zatim izmiješa te se apsorbancija odmah očita na 490 nm. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu. Baždarna krivulja izrađena je koristeći kafeinsku kiselinu kao standard.

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) uz kromatografsku kolonu Zorbax Extend C18 ($4,6 \times 250$ mm, 5 μm i.d.) te detektora s nizom fotodioda (DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Uzorci se injektiraju u sustav u volumenu od 5 μL , protokom 1 ml min^{-1} pri temperaturi kolone od 25 °C. Elucija se provodi gradijentno s dvokomponentnom mobilnom fazom koja se sastoji od otapala A (1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u destiliranoj vodi) i otapala B (1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u acetonitrilu) prema postupku prikazanom u tablici 3.

Tablica 3. Gradijent otapala za HPLC analizu polifenolnih spojeva

Vrijeme (min)	Otapalo A – volumni udio (%)	Otapalo B – volumni udio (%)	Protok (mL min^{-1})
0	93	7	1
5	93	7	1
45	60	40	1
47	30	70	1
52	30	70	1

Kromatogrami su snimani pri valnim duljinama od 320 i 350 nm što odgovara maksimumima apsorpcijskih spektara pojedinih polifenolnih spojeva. Identifikacija polifenolnih spojeva provodi se usporedbom retencijskih vremena pojedinih HPLC standarda i apsorpcijskih spektara.

In vitro digestija inkapsulata

Profil otpuštanja ukupnih polifenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina u uvjetima simulirane gastrointestinalne probave određen je pomoću želučane (engl. *Simulated Gastric Fluid, SGF*) i intestinalne tekućine (engl. *Simulated Intestinal Fluid, SIF*). Otpuštanje je praćeno određivanjem udjela ukupnih polifenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina koji su prethodno opisani. Želučana tekućina (pH=3) sastojala se od pepsina, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogen karbonata, natrijevog klorida, magnezijevog klorida heksahidrata i amonijevog karbonata, dok se intestinalna tekućina (pH=7) sastojala od pankreatina, žučnih soli, kalijevog klorida, kalijevog dihidrogen fosfata, natrijevog hidrogen karbonata, natrijevog klorida te magnezijevog klorida heksahidrata u koncentracijama koje su predložili Minekus i sur. (2014). 0,5 g inkapsuliranog ekstrakta prebacilo se u 70 mL otopine SGF-a uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici (100 rpm) pri 37 °C. U odgovarajućim vremenskim intervalima iz otopine je uzorkovano 1,5 mL alikvota do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 sata. Zatim su inkapsulirani ekstrakti prebačeni u 70 mL otopine SIF-a pri istim uvjetima. Postupak uzorkovanja alikvota u definiranim vremenskim intervalima ponovljen je na prethodno opisani način. Alikvotima je određen udjel ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina izražen kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu inkapsuliranog ekstrakta, odnosno mg kafeinske kiseline po gramu inkapsuliranog ekstrakta. Iz dobivenih rezultata određena je kinetika otpuštanja polifenola i hidroksicimetnih kiselina inkapsuliranih ekstrakata dobričice s različitim sustavima nosača.

3.2.3. Priprema uzoraka čokolade s inkapsuliranim ekstraktima

Izrada čokolada započela je temperiranjem čokoladne mase u uređaju za temperiranje (Pomati T5, Codogno, Italija), nakon čega se čokoladna masa dozirala u kalupe, pri čemu se vodilo računa da ne dođe do nastanka mjehurića zraka, te je slijedilo hlađenje. Za pripremu čokolada s liofiliziranim ekstraktom, izvaže se 1 % liofiliziranog ekstrakta u odnosu na masu

čokolade. Da bi se dobila ista količina suhe tvari ekstrakta u čokoladama s inkorporiranim inkapsulatima, potrebno je izvagati 5 puta veću masu inkapsulata. Izvagani liofilizirani i inkapsulirani ekstrakti potom se umiješaju u temperiranu čokoladnu masu te se funkcionalne čokolade prirede prema ranije opisanom postupku. Inkapsulati s najboljom kinetikom otpuštanja i najvećom inkapsulacijskom učinkovitošću korišteni su u izradi funkcionalnih čokolada.

3.2.3.1. Bioaktivna karakterizacija čokolada

U falcon epruvetu izvažuje se 3 g usitnjenih čokolada te se dodaje 10 mL petroletera u svrhu odmašćivanja uzoraka. Uzorak čokolade s otapalom miješa se 5 minuta na magnetskoj miješalici te se potom centrifugira (9500 rpm, 10 min, 4 °C). Nakon centrifugiranja supernatant se odvoji od taloga. Postupak se ponovi 2 puta s istim volumenom otapala. Preostali talog suši se u digestoru do isparavanja otapala, nakon čega se odmašćeni uzorci čokolade ekstrahiraju s 80 %-tnim (v/v) metanolom. U falcon epruvete s odmašćenim uzorcima čokolade dodaje se 10 mL 80 %-tnog (v/v) metanola. Ekstrakcija se provodi 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji te još 10 minuta na magnetskoj miješalici. Potom slijedi centrifugiranje (9500 rpm, 10 min, 4 °C) nakon čega se supernatant odvoji od taloga u menzuru. Postupak ekstrakcije ponovi se još jedanput s istim volumenom otapala tako da ukupni volumen iznosi 20 mL. Udjel polifenolnih spojeva u uzorcima čokolade određuje se koristeći HPLC metodologiju opisanu u poglavlju 3.2.2.3.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je formulirati inkapsulirane dozirne sustave polifenolnog ekstrakta dobričice (*Glechoma hederacea* L.) s različitim nosačima primjenom tehnike sušenja raspršivanjem. Ukupno je pripravljeno 6 dozirnih sustava s ekstraktima dobričice s djelomično hidroliziranom guar gumom kao osnovnim nosačem. Kontrolni uzorak sadržavao je samo djelomično hidroliziranu guar gumu kao nosač (DHGG), a u preostalim sustavima 25 % hidrolizirane guar gume zamijenjeno je drugim polimerima: hidrolizirani kolagen (DHGG_HK), karboksimetil celuloza (DHGG_KMC), nutrioza (DHGG_NUT), mucin (DHGG_MUC) i ksilan (DHGG_KSI). Formuliranim inkapsulatima određena su fizikalna (udio suhe tvari, prinos, močivost, nasipna gustoća, Carrov indeks, Hausnerov omjer, zeta potencijal i prosječni promjer) i bioaktivna svojstva (inkapsulacijska učinkovitost i *in vitro* digestija). Također, ispitan je potencijal primjene inkapsuliranih dozirnih sustava u razvoju funkcionalne čokolade.

4.1. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA INKAPSULATA

Fizikalna karakterizacija inkapsulata uključivala je određivanje prinosa, suhe tvari, močivosti, nasipne gustoće, Carrovog indeksa, Hausnerovog omjera, zeta potencijala i prosječnog promjera čestica. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Fizikalna karakterizacija inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem

Uzorak	Prinos (%)	Udio suhe tvari (%)	Prinos (%)	Močivost (s)	Nasipna gustoća (g mL ⁻¹)	Carrov indeks - CI (%)	Hausnerov omjer - HR	Zeta potencijal (mV)	Prosječni promjer (μm)
DHGG	47,17±1,17	96,07±0,17	47,17±1,17	43,0±1,0	0,24±0,00	79,6±0,4	4,91±0,09	- 15,76±1,62	9,49±3,00
DHGG_HK	96,07±0,85	97,09±0,22	96,07±0,85	215,5±3,5	0,29±0,00	20,3±0,3	1,25±0,00	- 10,18±3,40	7,73±2,11
DHGG_KMC	63,91±2,56	98,76±1,18	63,91±2,56	2553,5±12,5	0,20±0,00	21,5±0,2	1,27±0,02	- 22,03±0,12	9,72±4,26
DHGG_NUT	87,09±1,14	97,23±0,17	87,09±1,14	127,5±7,5	0,30±0,01	21,2±0,2	1,27±0,02	-5,32±1,38	7,91±2,21
DHGG_MUC	80,35±2,07	98,01±1,11	80,35±2,07	650,5±9,5	0,31±0,01	23,09±0,9	1,30±0,02	-8,81±0,51	8,59±2,62
DHGG_KSI	54,53±3,11	97,65±1,04	54,53±3,11	62,0±9,0	0,26±0,00	21,4±0,2	1,27±0,02	-9,33±3,19	10,05±2,96

DHGG – uzorak s djelomično hidroliziranom guar gumom; DHGG_HK – uzorak s djelomično hidroliziranom guar gumom i hidroliziranim kolagenom; DHGG_KMC – uzorak s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom; DHGG_NUT – uzorak s djelomično hidroliziranom guar gumom i nutriozom;

DHGG_MUC – uzorak s djelomično hidroliziranom guar gumom i mucinom; DHGG_KSI – uzorak s djelomično hidroliziranom guar gumom i ksilanom

Najviši prinos (96,07 %) dobiven je u sustavu s djelomično hidroliziranom guar gumom i hidroliziranim kolagenom (DHGG_HK), dok je najniži prinos (47,17 %) dobiven u sustavu u kojem je korištena samo djelomično hidrolizirana guar guma (DHGG). Prema rezultatima iz tablice 4, može se zaključiti da dodatak ispitivanih polimera povećava prinos sušenjem raspršivanjem.

Svim uzorcima određen je visok udio suhe tvari. Najniži udio suhe tvari (96,07 %) određen je u sustavu s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG), dok je najviši udio suhe tvari (98,76 %) određen u sustavu s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom (DHGG_KMC). Prema podacima iz tablice 4, vidljivo je da dodatak ispitivanih polimera utječe na povećanje udjela suhe tvari. Neznatne razlike u udjelu suhe tvari mogu se objasniti različitom kemijskom strukturom polimera (Kinalski i Noreña, 2019).

Močivost je jedno od rekonstitucijskih svojstava prahova. Seth i sur. (2017) definiraju močivost kao sposobnost praha da apsorbira vodu. Svi polimeri, izuzev ksilana, utjecali su na smanjenje močivosti inkapsulata (tablica 4). Najkraće vrijeme močivosti (43,00 s) izmjereno je za uzorak s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG), a najdulje vrijeme močivosti (2553,50 s) za uzorak s dodatkom karboksimetil celuloze (DHGG_KMC).

Dodatkom ispitivanih polimera u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom nasipna gustoća se povećala u svim uzorcima, izuzev onog s karboksimetil celulozom (DHGG_KMC; 0,20 g mL⁻¹). Niska vrijednost nasipne gustoće povećava mogućnost oksidacije zbog veće količine zraka unutar inkapsulata što u konačnici rezultira smanjenom stabilnošću tijekom skladištenja (Lourenço i sur., 2020). Najviša nasipna gustoća (0,31 g mL⁻¹) izmjerena je u uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom i mucinom (DHGG_MUC) što se može povezati s visokom molekulskom masom mucina. Mucin je visokomolekulski glikoprotein na čiju su okosnicu vezani oligosaharidi (Duffy i sur., 2015). Polimeri više molekulske mase lakše se prilagođavaju međuprostoru između čestica pri čemu zauzimaju manji volumen što rezultira većom nasipnom gustoćom. Prema radu Tonon i sur. (2010) najviša nasipna gustoća također je izmjerena kod inkapsulata pripremljenog s polimerom najveće molekulske mase (tapioka škrob).

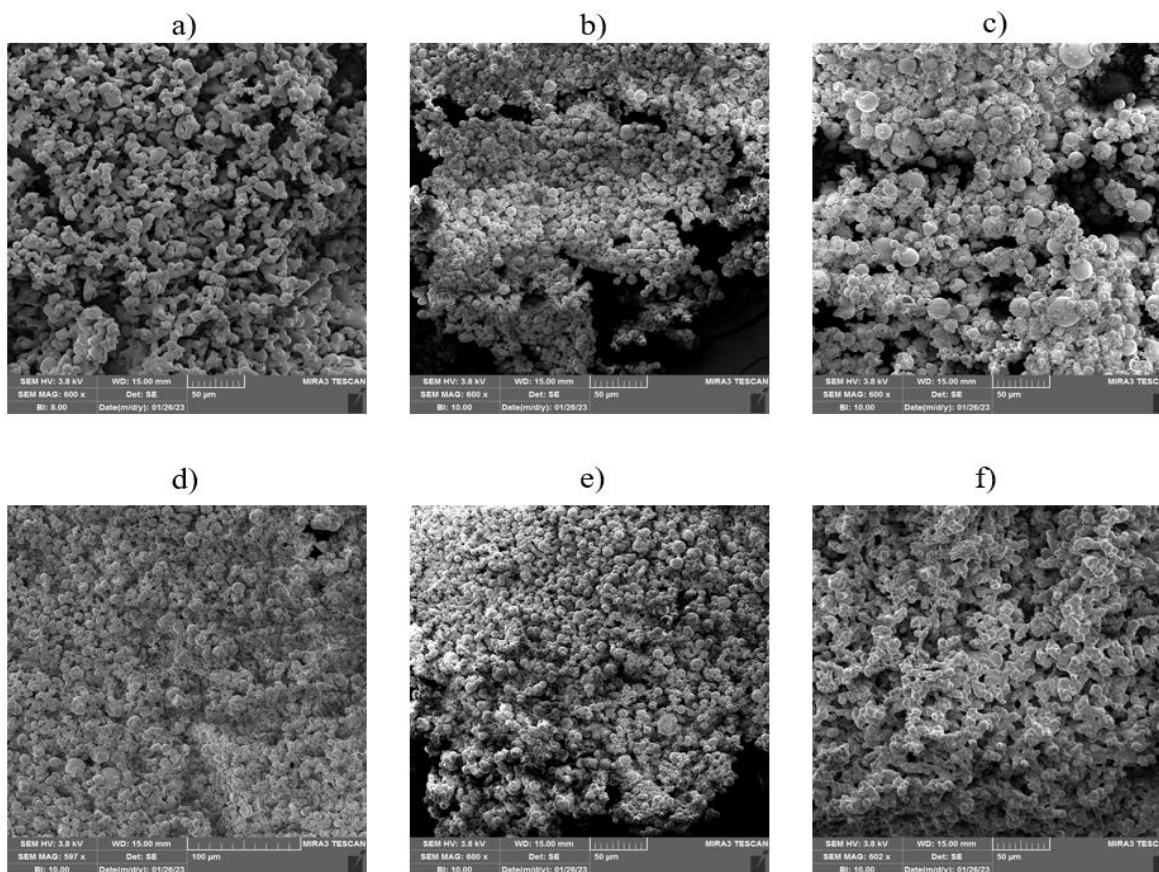
Svojstva tečenja inkapsulata izražavaju se Carrovim indeksom (CI), dok se kohezivnost izražava Hausnerovim omjerom (HR). Prema Carrovom indeksu protočnost prahova karakterizira se prema slijedećim vrijednostima: <15 iznimno dobra, 15-20 dobra, 20-35 prilično dobro, 35-45 loša i >45 vrlo loša. Kohezivnost, temeljena na Hausnerovom omjeru, definira se kao: niska za vrijednosti <1,2, srednja za vrijednosti 1,2-1,4 te visoka za vrijednosti >1,4 (Jinapong i sur., 2008). Iz podataka prikazanih u tablici 4 vidljivo je kako dodatak ispitivanih polimera poboljšava svojstva tečenja i kohezivnost inkapsulata. Carrov indeks za inkapsulat pripremljen s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG) iznosio je 79,60 % što karakterizira vrlo lošu protočnost (>45 %), dok su vrijednosti za ostale inkapsulate pripremljene s dodatkom drugih polimera pokazale prilično dobru protočnost (20-35 %). Isti trend zabilježen je kod određivanja kohezivnosti. Inkapsulatu s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG) određena je visoka kohezivnost (4,91), dok je kod ostalih inkapsulata kohezivnost okarakterizirana kao srednja (1,2-1,4). Niže vrijednosti Hausnerovog omjera impliciraju na bolju kohezivnost čestica praha (inkapsulata), koja su u korelaciji s boljim karakteristikama protočnosti. Prahovi koji imaju bolju protočnost pokazuju nisku tendenciju daljnje konsolidacije te se time može prevenirati prekid proizvodnje u industrijskim razmjerima (Lourenço i sur., 2020).

Zeta potencijal je parametar kojim se izražava površinski naboj čestica. Mjerenjem zeta potencijala dobiva se informacija o koloidnoj stabilnosti suspenzija i mogućnosti agregacije istih. Niska apsolutna vrijednost zeta potencijala sugerira na nedovoljno elektrostatsko odbijanje ili steričke smetnje između čestica što rezultira agregacijom (Esmaeilzadeh Kenari i Razavi, 2022). Prema radu Bhattacharjee (2016), apsolutne vrijednosti zeta potencijala $\pm 0-10$ mV karakteriziraju koloidne suspenzije kao vrlo nestabilne, dok se vrijednosti $\pm 10-20$ mV i $\pm 20-30$ mV karakteriziraju kao relativno stabilne i umjereno stabilne. Negativne vrijednosti zeta potencijala inkapsulata varirale su od -5,32 mV (DHGG_NUT) do -22,03 mV (PHGG_CMC). Dakle, iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je tendencija agregacije čestica najmanja u uzorku DHGG_KMC, dok je najveća mogućnost agregacije moguća u uzorku DHGG_NUT.

Morfološke karakteristike (slika 13) i veličina inkapsulata (tablica 4) određeni su skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Prosječni promjer inkapsulata varirao je od 7,73 μm (DHGG_HK) do 10,05 μm (DHGG_KSI). Promjer inkapsulata uobičajen je za čestice dobivene sušenjem raspršivanjem. Prosječni promjer čestica u sušenju raspršivanjem iznosi 1-15 μm (Man, Irwandi, & Abdullah, 1999). Slične vrijednosti promjera čestica (4,8-

14,3 μm) sušenjem raspršivanjem dobivene su u radu Kuck i Noreña (2016) koristeći djelomično hidroliziranu guar gumu kao nosač. SEM analizom primijećene su različite veličine čestica od manjih ($\sim 3 \mu\text{m}$) do većih ($\sim 20 \mu\text{m}$), što ukazuje na heterogenu raspodjelu veličine. Varijacija u veličini (polidisperzija) karakteristična je za čestice dobivene sušenjem raspršivanjem (Toledo Hijo i sur., 2014). Najizraženija polidisperzija uočena je u uzorku pripremljenom uz dodatak karboksimetil celuloze (DHGG_KMC) kao što je prikazano na slici 13 c). Karboksimetil celuloza posjeduje visoku viskoznost te se u prehrambenoj industriji koristi kao zgušnjivač (Rahman i sur., 2021). Prema Kuck i Noreña (2016), u sušenju raspršivanjem veličina čestica povezana je s viskoznošću polimera koji se koristi kao nosač, odnosno, povećanjem viskoznosti povećava se i veličina čestica. Nadalje, veličina čestica povezuje se s nasipnom gustoćom praha. U radu Tonon, Barber i Hubinger (2010), čestice s većim prosječnim promjerom imale su i veću vrijednost nasipne gustoće jer se manje čestice smještaju između većih te zauzimaju manji prostor. U ovome radu, primijećen je inverzan odnos. Veća razlika u veličini čestica rezultirala je manjom nasipnom gustoćom (tablica 4). Dakle, može se zaključiti da se manje čestice ne smještaju između većih i da prostor između njih ostaje prazan. Inverzan odnos zabilježen je i u radu Pieczykolan i Kurek (2019).

Morfološkom analizom uzorka s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG) utvrđen je nepravilan oblik čestica, ali glatka površina bez pukotina i udubljenja. Preostalim uzorcima utvrđen je relativno sferičan oblik čestica hrapavije površine, također bez pukotina i udubljenja. Konkavnost je uočena u uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom i mucinom (DHGG_MUC). Pojava konkavnosti može nastati kao rezultat brzog isparavanja vode tijekom sušenja raspršivanjem što dovodi do skupljanja čestica (Kuck i Noreña, 2016).

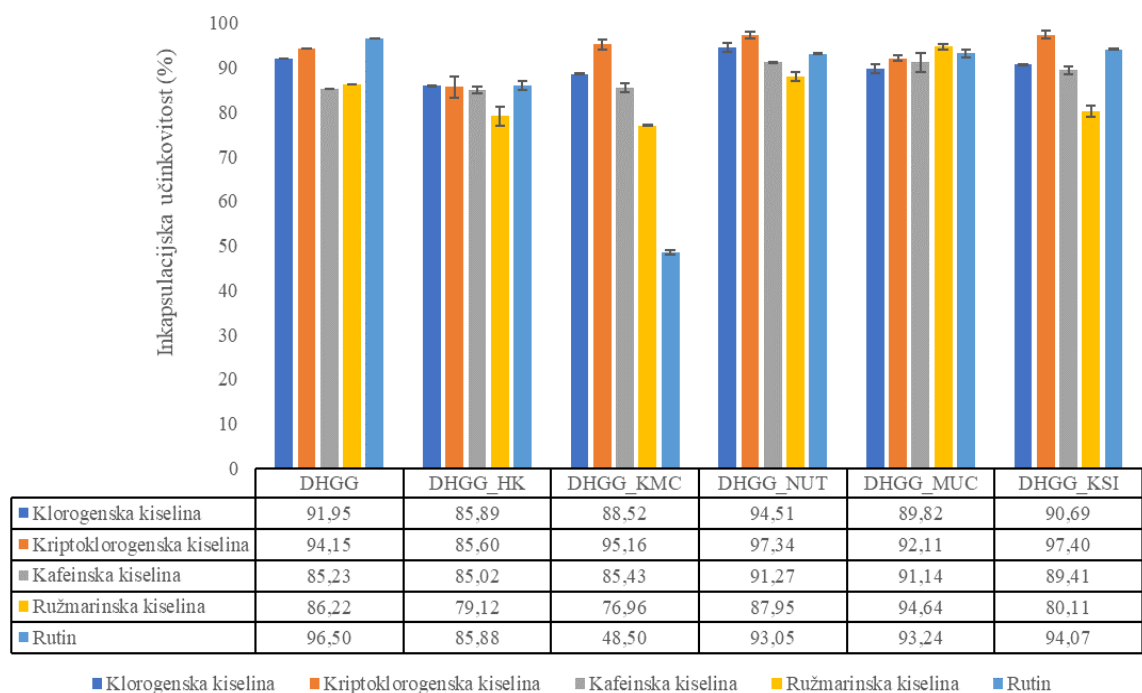


Slika 13. Morfološke strukture inkapsulata

(a) DHGG – uzorak s hidroliziranom guar gumom, b) DHGG_HK – uzorak s hidroliziranom guar gumom i hidroliziranim kolagenom, c) DHGG_KMC – uzorak s hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom, d) DHGG_NUT – uzorak s hidroliziranom guar gumom i nutrizom, e) DHGG_MUC – uzorak s hidroliziranom guar gumom i mucinom, f) DHGG_KSI – uzorak s hidroliziranom guar gumom i ksilanom)

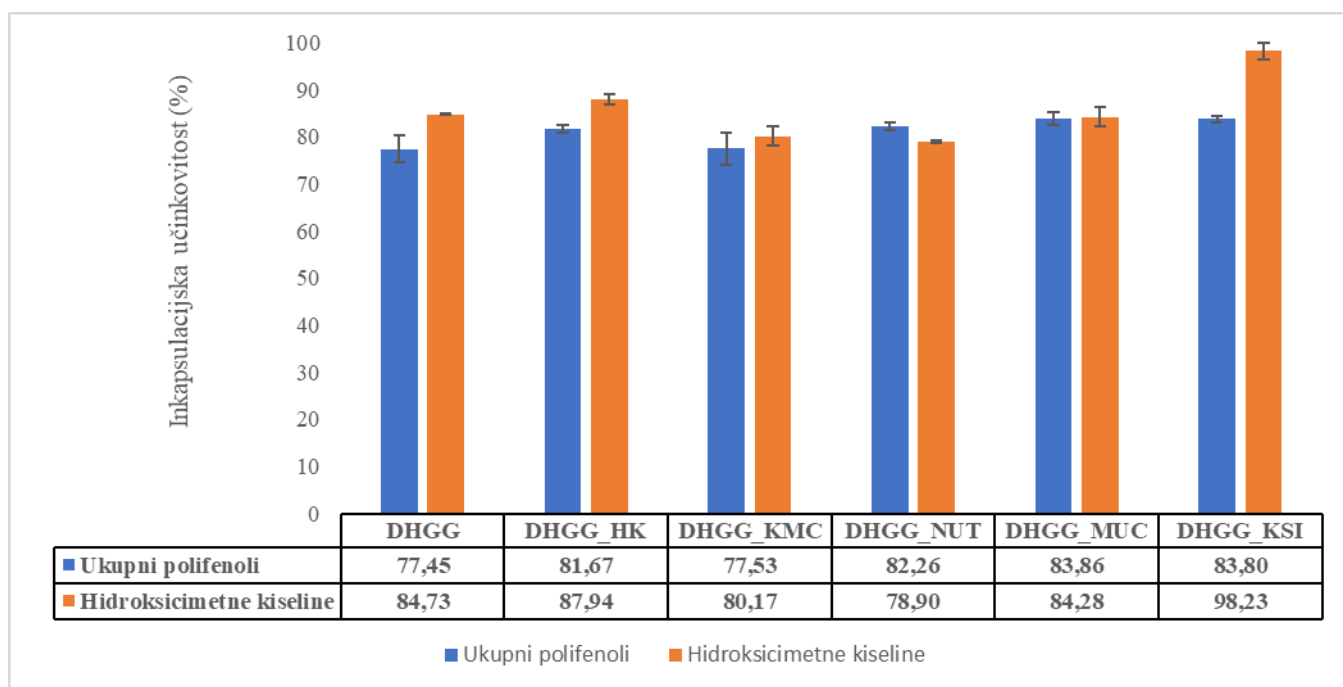
4.2. ODREĐIVANJE INKAPSULACIJSKE UČINKOVITOSTI

Inkapsulacijska učinkovitost jedno je od najvažnijih svojstava inkapsulata. U ovome radu inkapsulatima je određena inkapsulacijska učinkovitost pojedinačnih polifenolnih spojeva (slika 14), ukupnih polifenolnih spojeva te hidroksicimetnih kiselina (slika 15). Prethodna istraživanja usmjerena na polifenolni sastav dobričice pokazala su dominantnost fenolnih kiselina – ružmarinske, klorogenske, kafeinske te kriptoklorogenske kiseline i flavonoida od kojih je najviše zastupljen rutin (Šeremet i sur., 2022; Chou i sur., 2019).



Slika 14. Inkapsulacijska učinkovitost (%) pojedinačnih polifenolnih spojeva u inkapsulatima

U uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom i nutriziom (DHGG_NUT) utvrđena je najveća inkapsulacijska učinkovitost za klorogensku kiselinu (94,51 %), kriptoklorogensku kiselinu (97,34 %) i kafeinsku kiselinu (91,27 %). Uzorci s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG) i u kombinaciji s ksilanom (DHGG_KSI) također su pokazali visoku inkapsulacijsku učinkovitost za klorogensku kiselinu – 91,95 % i 90,69 %. Učinkovitost inkapsulacije kriptoklorogenske kiseline utvrđena je u visokom postotku u uzorcima s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom (DHGG_KMC) i djelomično hidroliziranom guar gumom i ksilanom (DHGG_KSI) – 95,16 % i 97,40 %. Kafeinska kiselina najbolje se inkapsulirala u uzorcima DHGG_NUT (91,27 %), DHGG_MUC (91,14 %) te DHGG_KSI (89,41 %). Ružmarinska kiselina je najzastupljeniji polifenolni spoj u dobričici (Šeremet i sur., 2022) i njezina najveća inkapsulacijska učinkovitost određena je u uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom i mucinom (DHGG_MUC) – 94,64 %. U uzorcima s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG) i hidroliziranom guar gumom i ksilanom (DHGG_KSI) određena je najveća inkapsulacijska učinkovitost rutina – 96,50 % i 94,07 %.



Slika 15. Inkapsulacijska učinkovitost (%) ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina

Uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG) utvrđena je inkapsulacijska učinkovitost od 77,45 % za ukupne polifenolne spojeve i 84,73 % za hidroksicimetne kiseline. Najveća inkapsulacijska učinkovitost za ukupne polifenolne spojeve utvrđena je u uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom i mucinom (DHGG_MUC) – 83,36 %, dok je za hidroksicimetne kiseline najviša inkapsulacijska učinkovitost utvrđena u sustavu s djelomično hidroliziranom guar gumom i ksilanom (DHGG_KSI) – 98,23 %. Nadalje, dodatak nutrioze i karboksimetil celuloze u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG_NUT i DHGG_KMC) rezultiralo je malim smanjenjem inkapsulacijske učinkovitosti hidroksicimetnih kiselina – 78,90 % i 80,17 %, iako su i te vrijednosti inkapsulacijske učinkovitosti i dalje visoke.

Djelomično hidrolizirana guar guma je polimer koji se izuzetno dobro otapa u vodi, a karakteriziraju je poželjna svojstva, kao što su odsustvo boje, mirisa i okusa te niska viskoznost (Kapoor i Juneja, 2009). Unatoč dobrim karakteristikama, samo je nekoliko znanstvenih radova u kojima se koristila kao nosač prilikom inkapsulacije polifenolnih spojeva sušenjem raspršivanjem. Piovesana i Noreña (2018) inkapsulirali su polifenolne spojeve hibiskusa sušenjem raspršivanjem koristeći ulaznu temperaturu od 140 °C i 10 %-tnu hidroliziranu guar gumu (DHGG) kao nosač. Učinkovitost inkapsulacije polifenola iznosila je 60,63 %. Kuck i Noreña (2016) također su inkapsulirali polifenolne spojeve iz kože grožđa

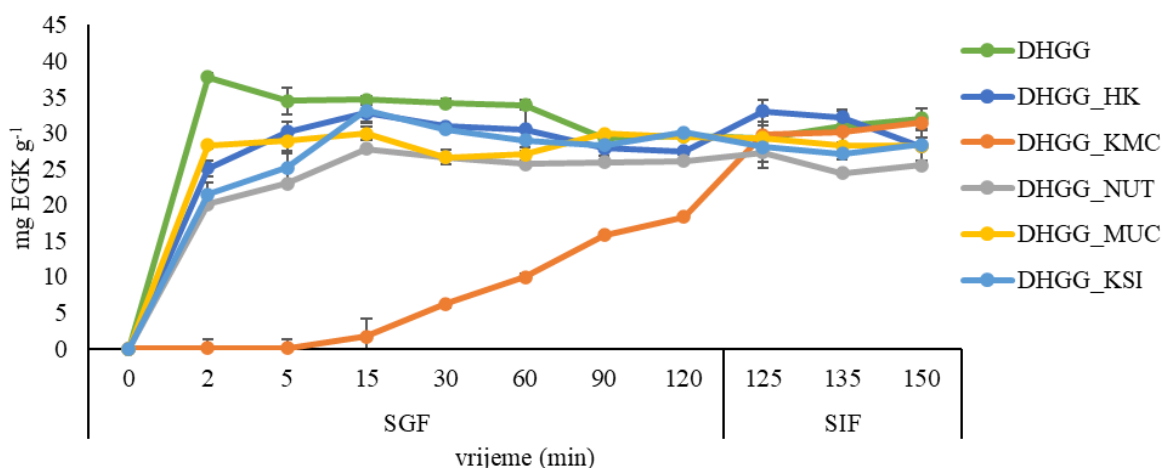
sušenjem raspršivanjem koristeći hidroliziranu guar gumu kao nosač, pri istim uvjetima kao i Piovesana i Noreña (2018), a inkapsulacijska učinkovitost polifenola iznosila je 81,61 %.

Primjena hidroliziranog kolagena u kombinaciji s kitozanom kao nosačem zabilježena je u radu Ocaka (2012) prilikom inkapsulacije ulja lavande primjenom kompleksne koacervacije. Upotreba hidroliziranog kolagena u kombinaciji s natrijevim alginatom značajno je povećala inkapsulacijsku učinkovitost polifenola zelenog čaja s 34,54 % na 85,06 %, u omjeru alginat : kolagen = 1,5 : 0,5 u radu Feng i sur. (2023). Jang i Koh (2023) inkapsulirali su antocijane aronije (*Aronia melanocarpa*) koristeći karboksimetil celulozu u kombinaciji s maltodekstrinom kao nosačem, a učinkovitost inkapsulacije iznosila je 97,71 %. Karboksimetil celuloza korištena je kao nosač u sušenju raspršivanjem (140 °C) prilikom inkapsulacije polifenola iz moringe (*Moringa oleifera*) s učinkovitošću inkapsulacije od 34,61 % (Castro-López i sur., 2021). Primjena mucina i ksilana kao nosača vrlo je ograničena. Mumuni i sur. (2020) inkapsulirali su inzulin tehnikom geliranja koristeći mucin i kitozan kao nosače. Upotreba ksilana kao nosača zabilježena je u radu Beckers i sur. (2020) gdje je korišten za inkapsulaciju fungicida u svrhu formuliranja biorazgradivog nanonosaa za razgradnju agrokemikalija i zaštite bilja.

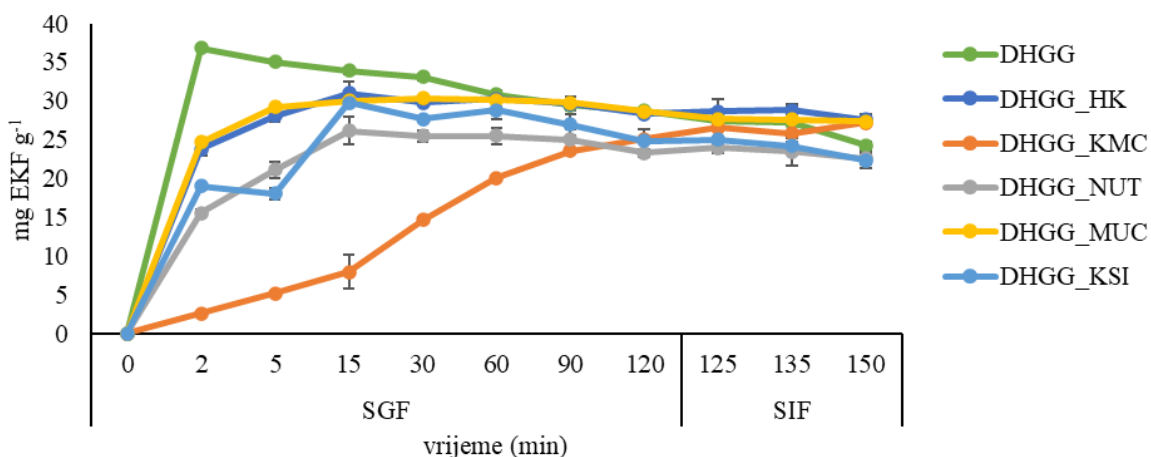
4.3. PROFIL OTPUŠTANJA UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA I HIDROKSICIMETNIH KISELINA INKAPSULATA

S nutritivnog stajališta, biodostupnost polifenolnih spojeva u hrani definira se kao udio spojeva iz hrane koji se oslobađaju tijekom probave u probavnom sustavu, pri čemu postaju dostupni za apsorpciju u crijevima. Stoga je važno provoditi istraživanja o biodostupnosti i probavnoj stabilnosti polifenolnih spojeva kako bi se utvrdilo iskorištenje u ljudskom organizmu te mogući pozitivni učinci na zdravlje. Simulirani modeli *in vitro* digestije predstavljaju korisnu, brzu i ponovljivu analizu za procjenu stabilnosti i dostupnosti različitih polifenolnih spojeva u probavnom sustavu (Peanparkdee i Iwamoto, 2022).

Na slici 16 prikazan je profil otpuštanja ukupnih polifenolnih spojeva, dok je na slici 17 prikazan profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u inkapsulatima. Simulirani uvjeti probave proveli su se koristeći simuliranu otopinu želučane tekućine (SGF) i intestinalne tekućine (SIF).



Slika 16. Profil otpuštanja ukupnih polifenola u inkapsulatima



Slika 17. Profil otpuštanja hidroksicimetnih kiselina u inkapsulatima

Najbrže otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina određeno je u uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom (DHGG). Tijekom prve 2 minute u otopini SGF-a otpušteno je 25,07 mg EGK g⁻¹ ukupnih polifenola te 36,85 mg EKF g⁻¹ hidroksicimetnih kiselina. Dodatak različitih polimera produljio je otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina. Uzorci s djelomično hidroliziranom guar gumom i hidroliziranim kolagenom (DHGG_HK), nutrizom (DHGG_NUT), mucinom (DHGG_MUC) te ksilanom (DHGG_KSI) pokazali su produljeno otpuštanje do 15-te minute u otopini SGF-a. Zatim je zabilježen kontinuirani trend otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, uz manje oscilacije, sve do završetka intestinalne faze. Iako je nastavljeno kontinuirano otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, stopa

otpuštanja smatra se visokom. Najbolji profil otpuštanja primijećen je u uzorku s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom (DHGG_KMC). Zabilježeno je vrlo sporo otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina tako da je u 30-oj minuti otpušteno samo 6,20 mg EGK g⁻¹ polifenolnih spojeva i 14,66 mg EKF g⁻¹ hidroksicimetnih kiselina. U 60-oj minuti zabilježeno je „značajnije“ otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina koje je iznosilo 9,99 mg EGK g⁻¹ polifenolnih spojeva te 19,95 mg EKF g⁻¹ hidroksicimetnih kiselina. Kontrolirano otpuštanje nastavilo se sve do 120-te minute. Nakon prebacivanja u otopinu SIF-a, zabilježen je nagli skok u otpuštanju ukupnih polifenola u 125-oj minuti – 29,71 mg EGK g⁻¹. Fluktuacije u otpuštanju hidroksicimetnih kiselina, nakon prebacivanja u otopinu SIF-a, nisu zabilježene. Nastavljen je trend kontinuiranog otpuštanja ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina sve do završetka intestinalne faze.

Navedeni rezultati *in vitro* digestije inkapsulata mogu se objasniti fizikalnim karakteristikama polimera. Naime, svi polimeri korišteni u ovome radu izrazito su topljivi u vodi, što potvrđuju i rezultati vremena močivosti (tablica 4). Nadalje, naglo otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina u gastričnoj fazi (SGF) može se objasniti „puknućem“ inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem prilikom kontakta s otopinom SGF-a. Puknuće uzrokuje naglo oslobađanje inkapsuliranih biološki aktivnih spojeva (Lee i sur., 2009). Najbolji profil otpuštanja u uzorku DHGG_KMC, također se može povezati s vremenom močivosti, obzirom da je ovaj uzorak imao najdulje vrijeme močivosti od čak 2553,5 s.

4.4. POLIFENOLNI SASTAV FUNKCIONALNIH ČOKOLADA

Inkapsulat s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom (DHGG_KMC) pokazao je najbolju kinetiku otpuštanja ukupnih polifenolnih spojeva i hidroksicimetnih kiselina (slika 16 i 17), a uzorak s hidroliziranom guar gumom i ksilanom (DHGG_KSI) pokazao je najvišu inkapsulacijsku učinkovitost hidroksicimetnih kiselina (slika 15) te su isti odabrani za formulaciju funkcionalnih čokolada (Č_DHGG_CMC i Č_DHGG_KSI). Osim navedenih uzoraka pripremljena je i čokolada s dodatkom liofiliziranog ekstrakta (Č_LE), kao oblik neinkapsuliranog, odnosno slobodnog ekstrakta. U novorazvijenim čokoladama identificirane su fenolne kiseline - klorogenska, kafeinska i ružmarinska kiselina, a od flavonoida rutin, porijeklom iz inkorporiranog ekstrakta dobričice. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Udjeli polifenolnih spojeva u uzorcima funkcionalnih čokolada (mg g^{-1} čokolade).

<i>Polifenolni spoj</i>	Č_LE	Č_DHGG_KMC	Č_DHGG_KSI
<i>Klorogenska kiselina</i>	0,014±0,000	0,020±0,000	0,015±0,000
<i>Kafeinska kiselina</i>	0,022±0,001	0,036±0,002	0,033±0,001
<i>Ružmarinska kiselina</i>	0,082±0,000	0,045±0,000	0,034±0,000
<i>Rutin</i>	0,023±0,000	0,017±0,003	0,015±0,000

Č_LE – čokolada s liofiliziranim ekstraktom; Č_DHGG_KMC – čokolada s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom; Č_DHGG_KSI – čokolada s djelomično hidroliziranom guar gumom i ksilanom

Klorogenska ($0,020 \text{ mg g}^{-1}$) i kafeinska ($0,036 \text{ mg g}^{-1}$) kiselina kvantificirane su u najvećem udjelu u uzorku čokolade pripremljenom s inkapsulatom s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom (Č_DHGG_CMC). U uzorku čokolade pripremljenom s inkapsulatom s dodatkom ksilana (Č_DHGG_KSI) također je uočen veći udio kafeinske kiseline ($0,033 \text{ mg g}^{-1}$) u usporedbi s uzorkom čokolade pripremljenim s liofiliziranim ekstraktom (Č_LE) u kojem je kvantificiran udio kafeinske kiseline od $0,022 \text{ mg g}^{-1}$. Nije primijećena značajna razlika u udjelu klorogenske kiseline u uzorcima čokolade s liofiliziranim ekstraktom ($0,014 \text{ mg g}^{-1}$) i čokolade s inkapsulatom ksilana ($0,015 \text{ mg g}^{-1}$). Ružmarinska kiselina, kao najzastupljeniji fenolni spoj u dobriči, kvantificirana je u najvišem udjelu u uzorku čokolade pripremljenom s liofiliziranim ekstraktom (Č_LE) i to u udjelu od $0,082 \text{ mg g}^{-1}$. Isto je zabilježeno i za rutin ($0,023 \text{ mg g}^{-1}$).

U čokoladama pripremljenima s inkapsulatima Č_DHGG_KMC i Č_DHGG_KSI određen je manji udjel ružmarinske kiseline ($0,045$ i $0,034 \text{ mg g}^{-1}$) u usporedbi s čokoladom s liofiliziranim ekstraktom ($0,082 \text{ mg g}^{-1}$). U slučaju rutina, zabilježeni su slični udjel kod svih uzoraka čokolada (Č_DHGG_KMC: $0,017 \text{ mg g}^{-1}$; Č_DHGG_KSI: $0,015 \text{ mg g}^{-1}$; i Č_LE: $0,023 \text{ mg g}^{-1}$). Viši udjel ružmarinske kiseline u uzorku čokolade s liofiliziranim ekstraktom u odnosu na uzorke čokolade s inkapsulatima pripremljenima sušenjem raspršivanjem, može se objasniti samom izvedbom procesa. Liofilizacija je proces koji se primjenjuje za toplinski osjetljive materijale gdje se materijal prvo smrzava, a zatim podvrgava sublimaciji kako bi se

uklonila voda (Rezvankhah i sur., 2019). Obzirom da se u sušenju raspršivanjem koriste visoke temperature, moguće je da je došlo do djelomične razgradnje ružmarinske kiseline. U istraživanju Ermis i Özkan (2021) prah crvene cikle inkapsuliran je sušenjem raspršivanjem i liofilizacijom, s ciljem obogaćivanja namaza od kakaa i lješnjaka. Udio ukupnih polifenola određen je u većem udjelu u liofiliziranim prahovima (466,08 mmol GAE g⁻¹ uzorka) nego u prahovima dobivenima sušenjem raspršivanjem (236,00 mmol GAE g⁻¹ uzorka). Chen i sur. (2017), također su potvrdili veći udjel polifenola u liofiliziranim prahovima lovora (14,19 mg g⁻¹ uzorka) u odnosu na sušene raspršivanjem (7,37 mg g⁻¹ uzorka). Čokolada pripremljena s inkapsulatom s karboksimetil celulozom (Č_DHGG_KMC) sadrži veći udjel sva 4 identificirana polifenolna spoja u odnosu na čokoladu pripremljenu s inkapsulatom s ksilanom (Č_DHGG_KSI). Navedeni rezultati potvrđeni su i boljom kinetikom otpuštanja ukupnih polifenola i hidrokscimetnih kiselina (slika 16 i slika 17). Uzorak Č_DHGG_KMC bolje zadržava polifenolne spojeve i stoga pokazuje dobar potencijal za inkapsulaciju polifenolnih spojeva.

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak ispitivanih polimera (hidrolizirani kolagen, karboksimetil celuloza, nutrioza, mucin i ksilan) u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom rezultirao je povećanjem prinosa inkapsulacije.
2. Dodatak ispitivanih polimera u sustav s djelomično hidroliziranom guar gumom utjecao je na smanjenje močivost dobivenih inkapsulata. Također, dodatkom polimera poboljšana su svojstva tečenja i kohezivnosti. Apsolutne vrijednosti zeta potencijala svih dozirnih sustava upućuju na nisku tendenciju agregacije.
3. Morfološkom analizom čestica vidljivo je da su uglavnom sferičnog oblika, glatke površine, bez pukotina i udubljenja, ovisno o korištenom polimeru. Raspodjela veličine čestica je heterogena.
4. Najveća inkapsulacijska učinkovitost ukupnih polifenolnih spojeva određena je u sustavu s djelomično hidroliziranom guar gumom i mucinom, a najveća inkapsulacijska učinkovitost hidroksicimetnih kiselina određena je u sustavu s djelomično hidroliziranom guar gumom i ksilanom.
5. Poželjno kontrolirano i kontinuirano otpuštanje ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina u simuliranim uvjetima probavnog sustava pokazao je inkapsulat s djelomično hidroliziranom guar gumom i karboksimetil celulozom.
6. Novorazvijenim čokoladama s dodatkom inkapsulata dobričice uspješno je obogaćen polifenolni sastav i antioksidacijska svojstva.

- Beckers SJ, Wetherbee L, Fischer J, Wurm FR (2020) Fungicide-loaded and biodegradable xylan-based nanocarriers. *Biopolymers* **111**, 1–6. <https://doi.org/10.1002/bip.23413>
- Bhattacharjee S (2016) DLS and zeta potential—what they are and what they are not? *J Contr Rel* **235**, 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bravo L (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* **56**, 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**, 1–38. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Bušić A, Komes D, Belščak-Cvitanović A, Vojvodić Cebin A, Špoljarić I, Mršić G, Miao S. (2018) The potential of combined emulsification and spray drying techniques for encapsulation of polyphenols from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Food Technol Biotechnol* **56**, 494-505. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5680>
- Castro-López C, Espinoza-González C, Ramos-González R, Boone-Villa VD, Aguilar-González MA, Martínez-Ávila GCG, i sur. (2021) Spray-drying encapsulation of microwave-assisted extracted polyphenols from *Moringa oleifera*: Influence of tragacanth, locust bean, and carboxymethyl-cellulose formulations. *Food Res Int* **144**, 110290-. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110291>
- Cheng AW, Xie HX, Qi Y, Liu C, Guo X, Sun JY, i sur. (2017) Effects of storage time and temperature on polyphenolic content and qualitative characteristics of freeze-dried and spray-dried bayberry powder. *LWT - Food Sci Technol* **78**, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.027>
- Chou ST, Ho BY, Tai YT, Huang CJ, Chao WW (2020) Bidirect effects from cisplatin combine with rosmarinic acid (RA) or hot water extracts of *Glechoma hederacea* L. (HWG) on renal cancer cells. *Chinese Med (United Kingdom)* **15**, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13020-020-00358-2>
- Chou ST, Lin TH, Peng HY, Chao WW (2019) Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* L. and its antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Life Sci* **231**, 1–37. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.075>
- 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>
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* **43**, 348–361.
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Borneo F, Fern EB (1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *Br J Nutr* **81**, 1–27. <https://doi.org/10.1079/BJN19990002>
- Döring AS, Petersen M (2014) Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochem Lett* **10**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.05.012>
- Duffy CV, David L, Crouzier T (2015) Covalently-crosslinked mucin biopolymer hydrogels for sustained drug delivery. *Acta Biomater* **20**, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.024>
- Ermis E, Özkan M (2021) Sugar beet powder production using different drying methods, characterization and influence on sensory quality of cocoa-hazelnut cream. *J Food Sci Technol* **58**, 2068–2077. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04715-9>
- Esmailzadeh Kenari R, Razavi R (2022) Phenolic profile and antioxidant activity of free/bound phenolic compounds of sesame and properties of encapsulated nanoparticles in different wall materials. *Food Sci Nutr* **10**, 525–535. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2712>
- Feng Y, Niu L, Sun C, Tu J, Yu L, Xiao J (2023) Collagen hydrolysates improve the efficiency of sodium alginate-encapsulated tea polyphenols in beads and the storage stability after commercial sterilization. *Int J Biol Macromol* **231**, 123314. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123314>
- Flores FP, Singh RK, Kong F (2014) Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *J Food Eng* **137**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.034>
- Furuta T, Neoh TL (2021) Microencapsulation of food bioactive components by spray drying: A review. *Dry Technol* **39**, 1800–1831. <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1862181>
- Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN (1999) Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr* **50**, 213–224. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>

- Gibis M, Zeeb B, Weiss J (2014) Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocoll* **38**, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.014>
- Granato D, Barba FJ, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2020) Functional Foods : Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing and Safety. *Annu Rev of Food Sci Technol* **11**, 91–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Goldoni L, (2004) Tehnologija konditorskih proizvoda I.dio, Kugler, Zagreb.
- Han X, Xing Z, Si S, Yao Y, Zhang Q (2014) Electrospun grape seed polyphenols/gelatin composite fibers contained silver nanoparticles as biomaterials. *Fibers Polym* **15**, 2572–2580. <https://doi.org/10.1007/s12221-014-2572-y>
- Henry CJ (2010) Functional foods. *Eur J Clin Nutr* **64**, 657–659. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.101>
- Hoskin RT, Grace MH, Xiong J, Lila MA (2023). Spray-drying microencapsulation of blackcurrant and cocoa polyphenols using underexplored plant-based protein sources. *J Food Sci* **88**, 2665-2678. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16590>
- Hossain MN, Ranadheera CS, Fang Z, Ajlouni S (2021) Impact of encapsulating probiotics with cocoa powder on the viability of probiotics during chocolate processing, storage, and in vitro gastrointestinal digestion. *J Food Sci* **86**, 1629-1641. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15695>
- Jędrusek-golińska A, Wieczorowska-tobis K, Szymandera-buszka K, Górecka D, Buchowski M, Gramza-michałowska A (2020) Recent progress in the use of functional foods for older adults: A narrative review. *Compr Rev In Food Sci Food Saf*, 1–22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12530>
- Jang Y, Koh E (2023) Characterisation and storage stability of aronia anthocyanins encapsulated with combinations of maltodextrin with carboxymethyl cellulose, gum Arabic and xanthan gum. *Food Chem* **405**, 135002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135002>
- Jinapong N, Suphantharika M, Jamnong, P (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *J Food Eng* **84**, 194– 205. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032>

- Kim J, Song S, Lee I, Kim Y, Yoo I, Ryoo I, i sur. (2011) Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba*. *Bioorganic Med Chem Lett* **21**, 3483–3487. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.002>
- Kinalski T, Noreña CPZ (2019) Effect of spray drying encapsulation of garlic extract on inulin and thiosulfinates contents. *J Food Meas Charact* **13**, 2438–2447. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00164-x>
- Kuck LS, Noreña CPZ (2016) Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. *Bordo*) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chem* **194**, 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>
- Kuhn H, Wiesner R (1989) Occurrence of free and esterified lipoxygenase products in leaves of *Glechoma hederacea* L. and other *Labiatae*. *Eur J Biochem* **162**, 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15190.x>
- Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD (2002) Biological activity of *Glechoma hederacea*. *Fitoterapia* **73**, 721–723. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00237-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00237-X)
- Lee JS, Kim EJ, Chung D, Lee HG (2009) Characteristics and antioxidant activity of catechin-loaded calcium pectinate gel beads prepared by internal gelation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **74**, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.018>
- Lončarević I, Pajin B, Petrović J, Zarić D, Šaponjac VT, Fišteš A, i sur. (2019) The physical properties, polyphenol content and sensory characteristics of white chocolate enriched with black tea extract. *Food Health Dis* **8**, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.002>
- Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD (2020) Microencapsulation of pineapple peel extract by spray drying using maltodextrin, inulin, and Arabic gum as wall matrices. *Foods* **9**, 1–17. <https://doi.org/10.3390/FOODS9060718>
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jime L (2018) Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. *Am J Clin Nutr* 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Marisa Ribeiro A, Estevinho BN, Rocha F (2020) Microencapsulation of polyphenols - The specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review.

- Trends Food Sci Technol* **105**, 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.011>
- Martirosyan DM, Singh J (2015) A new definition of functional food by FFC : what makes a new definition unique?. *Funct Foods Heal Dis* **5**, 209–223.
- Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J Med Plant Res* **2**, 321 - 330.
- Mitich LW (1994) The Intriguing World of Weeds. *Weed Technol* **8**, 413–415. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00032103>
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlilieu C i sur. (2014) A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function* **5**, 1113-1124. <http://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mumuni MA, Kenechukwu FC, Ofokansi KC, Attama AA, Díaz DD (2020) Insulin-loaded mucoadhesive nanoparticles based on mucin-chitosan complexes for oral delivery and diabetes treatment. *Carbohydr Polym* **229**, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115506>
- Munin A, Edwards-Lévy F (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 793-829. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- Narodne Novine (2005) Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_73_1440.html .Pristupljeno 20. svibnja 2023
- Nikolić T, Rešetnik I (2007) Plant uses in Croatia. *Phytol Balcanica* **13**, 229–238.
- Ocak B (2012) Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. *J Environ Manage* **100**, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.02>
- Padma Ishwarya S, Anandharamakrishnan C (2017) 2 Spray drying : principle of operation. *Handb Dry Dairy Prod*, 58–93. <https://doi.org/10.1002/9781118930526.ch5>
- Păvăloiu RD, Sha’at F, Neagu G, Deaconu M, Bubueanu C, Albulescu A i sur. (2021) Encapsulation of polyphenols from *lycium barbarum* leaves into liposomes as a strategy to improve their delivery. *Nanomaterials* **11**, 1–13. <https://doi.org/10.3390/nano11081938>
- Peanparkdee M, Iwamoto S (2022) Encapsulation for Improving in Vitro Gastrointestinal

- Digestion of Plant Polyphenols and Their Applications in Food Products. *Food Rev Int* **38**, 335–353. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1733595>
- Piñón-Balderrama CI, Leyva-Porras C, Terán-Figueroa Y, Espinosa-Solís V, Álvarez-Salas C, Saavedra-Leos MZ (2020) Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. *Processes* **8**, 1–29. <https://doi.org/10.3390/PR8080889>
- Plasek B, Kasza G, Temesi Á (2020) Consumer Evaluation of the Role of Functional Food Products in Disease Prevention and the Characteristics of Target groups. *Nutrients* **12**, 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12010069>
- Rahman MS, Hasan MS, Nitai AS, Nam S, Karmakar AK, Ahsan MS i sur. (2021) Recent developments of carboxymethyl cellulose. *Polymers (Basel)* **13**, 1–48. <https://doi.org/10.3390/polym13081345>
- Rezvankhah A, Emam-djomeh Z, Askari G (2019) Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Dry Technol*, 1–24. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>
- Risch SJ (1995) Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. American Chemical Society, Washington DC.
- Scalbert A, Williamson G (2000) Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols 1. *J Nutr* **130**, 2073–2085.
- Šeremet D, Aladić K, Butorac A, Lovri M, Tušek AJ, Jokić S (2022) Comprehensive Study of Traditional Plant Ground Ivy (*Glechoma hederacea* L.) Nutritional and Bioactive Composition. *Foods* **11**, 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods11050658>
- Shahbazi S, Didar Z, Vazifedoost M, Naji-tabasi S, Branch N (2022) Enrichment of dark chocolate with free and microencapsulated white tea and jujube extracts: Impacts on antioxidant, physicochemical, and textural properties. *Qual Assur Saf Crop Foods* **14**, 188–201. <https://doi.org/10.15586/qas.v14i4.1099>
- Shahidi F, Yeo JD (2016) Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules* **21**, 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- 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>

Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rougé P, Van Damme EJM, Alvarez RA i sur. (2006) Carbohydrate specificity of an insecticidal lectin isolated from the leaves of *Glechoma hederacea* (ground ivy) towards mammalian glycoconjugates. *Biochem J* **393**, 331-341. <https://doi.org/10.1042/BJ20051162>

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

Toledo Hijo AAC, Da Costa JMG, Silva EK, Azevedo VM, Yoshida MI, Borges SV (2014) Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles. *J Food Process Eng* **38**, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12120>

Tolve R, Condelli N, Caruso MC, Barletta D, Favati F, Galgano F (2018) Fortification of dark chocolate with microencapsulated phytosterols: Chemical and sensory evaluation. *Food Funct* **9**, 1265–1273. <https://doi.org/10.1039/c7fo01822c>

Vehring R, Foss WR, Lechuga-Ballesteros D (2007) Particle formation in spray drying. *J Aerosol Sci* **38**, 728–746. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2007.04.005>

Wang J, Martínez-Hernández A, de Lamo-Castellví S, Romero MP, Kaade W, Ferrando M i sur. (2020) Low-energy membrane-based processes to concentrate and encapsulate polyphenols from carob pulp. *J Food Eng* **281**, 109996. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109996>

Wang YY, Lin SY, Chen WY, Liao SL, Wu CC, Pan PH, i ostali (2017) *Glechoma hederacea* extracts attenuate cholestatic liver injury in a bile duct-ligated rat model. *J Ethnopharmacol* **204**. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.011>

Würth R, Foerst P, Kulozik U (2018) Effects of skim milk concentrate dry matter and spray drying air temperature on formation of capsules with varying particle size and the survival microbial cultures in a microcapsule matrix. *Dry Technol* **36**, 93–99. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1301952>

Ye Q, Georges N, Selomulya C (2018) Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends Food Sci Technol* **78**, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>

Zanoni F, Primiterra M, Angeli N, Zoccatelli G (2020) Microencapsulation by spray-drying of

polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: Effects on stability and color properties. *Food Chem* **307**, 125535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125535>

Zarić DB, Rakin MB, Lončarević IS, Pajin BS (2016) Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball milvances. *RSC Adv* 1–33. <https://doi.org/10.1039/C5RA21363K>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in black ink, reading "Žepić", written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal line.

Vlastoručni potpis